

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: C07K 5/062, 5/083, C07C 327/26, 323/52, A61K 51/04, 51/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/12610 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1995 (11.05.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/01295 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1994 (27.10.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 37 600.2 1. November 1993 (01.11.93) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SPIES, Hartmut [DE/DE]; Räcknitzhöhe 49, D-01217 Dresden (DE). SCHULZE, Paul-Eberhard [DE/DE]; Endestrasse 30, D-14109 Berlin (DE). NOLL, Bernd [DE/DE]; Dresdner Strasse 104, D-01705 Freital (DE). NOLL, Steffi [DE/DE]; Dresdner Strasse 104, D-01705 Freital (DE). DINKELBORG, Ludger [DE/DE]; Emdenzeile 5, D-13585 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: N-ALKYL PEPTIDE CHELATE FORMERS, THEIR METAL COMPLEXES WITH RADIONUCLIDES, PROCESSES FOR PRODUCING THEM AND RADIO-PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THESE COMPOUNDS (54) Bezeichnung: N-ALKYL-PEPTIDCHELATBILDNER, DEREN METALLKOMPLEXE MIT RADIONUKLIDEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND DIESE VERBINDUNGEN ENTHALTENDE RADIOPHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN (57) Abstract <p>The invention relates to N-alkyl peptide chelate formers, their metal complexes with radionuclides, processes for their production and radio-pharmaceutical compositions containing these compounds. The invention also relates to radio-pharmaceuticals containing these chelates in metal-complexed form, diagnostic kits in which the chelate may be present in non-complexed form and is complexed by the addition of either technetium or rhenium ions, and the use of such preparations for diagnostic and therapeutic purposes.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft N-Alkyl-Peptid-Chelatbildner, deren Metallkomplexe mit Radionukliden, Verfahren zu deren Herstellung und diese Verbindungen enthaltende radiopharmazeutische Zusammensetzungen. Die Erfindung betrifft ferner Radiopharmazeutika, welche diese Chelate in mit Metallen komplexierter Form enthalten, deren diagnostische Kits, in denen das Chelat in nicht komplexierter Form vorliegen kann und entweder durch Zusatz von Technetium- oder Rhenium-Ionen komplexiert wird und auch über die Anwendung solcher Präparate für diagnostische und therapeutische Zwecke.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

N-Alkyl-Peptidchelatlbildner, deren Metallkomplexe mit Radionukliden, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende radiopharmazeutische Zusammensetzungen

5

Die Erfindung betrifft N-Alkyl-Peptid-Chelatbildner, deren Metallkomplexe mit Radionukliden, Verfahren zu deren Herstellung und diese Verbindungen enthaltende radiopharmazeutische Zusammensetzungen.

10

Die Erfindung betrifft ferner Radiopharmazeutika, welche diese Chelate in mit Metallen komplexierter Form enthalten, deren diagnostische Kits, in denen das Chelat in nicht komplexierter Form vorliegen kann und entweder durch Zusatz von Technetium- oder Rhenium-Ionen komplexiert wird und auch über die Anwendung solcher Präparate für diagnostische und therapeutische Zwecke.

15

Radioaktiv markierte Substanzen werden vor allem in der medizinischen Diagnostik angewandt, um Verformungen und Funktionsänderungen innerer Organe oder Änderungen pathologischer Prozesse im Körper festzustellen. Für diese Anwendung wird dem Patienten eine Formulierung verabreicht, z.B. in Form einer Injektionslösung, welche die radioaktive Substanz enthält. Mit geeigneten Detektoren (z.B. einer Gamma-Kamera) können durch Aufzeichnen der emittierten Strahlung Bilder von Organen, pathologischen Prozessen und deren Veränderungen im Körper erhalten werden; bei besonders hohen Anreicherungen in Organen oder Gefäßen dienen sie als Therapeutika.

20

25

30

In den vergangenen Jahren wuchs das Verlangen nach spezifischen, radioaktiv markierten, chemischen Verbindungen, die an sogenannte Trägermoleküle (z.B. Steroide, Antikörper, Lipide, Proteohormone etc.) gekoppelt werden können und nach dem Prinzip des "Drug Targeting" wirken. Von besonderem Interesse für die Tumordiagnose und Therapie sowie zur Rezeptordarstellung (z.B. Steroidkonjugate,

35

Antikörper, etc.), sind solche Substanzen, die befähigt sind, die Zellwand und die Blut-Hirn-Schranke zu passieren sowie Substanzen zur Überprüfung von Organfunktionen, z.B. vor und nach erfolgten Transplantationen und zum Auffinden von Gefäßläsionen. Mit dem Ziel, eine höhere Selektivität des Radiopharmazeutikums und eine damit verbundene signifikante Anreicherung eines Radionuklids im Zielorgan zu erhalten, werden verstärkt Komplexbildner für eine Vielzahl von Radionukliden entwickelt und an gewebe- oder stoffwechselspezifische Trägermoleküle gekoppelt. Für die Therapie sucht man nach Möglichkeiten, ein radioaktives Isotop des Rhenium anzuwenden.

Das am häufigsten verwendete Radionuklid ist Technetium-99m, das sich aufgrund seiner günstigen physikalischen Eigenschaften (keine Korpuskularstrahlung, günstige physikalische Halbwertszeit, 140 KeV γ -Strahlung) und der damit verbundenen geringen Strahlenbelastung besonders gut als Isotop für die in-vivo-Diagnostik eignet. Technetium-99m läßt sich ohne Aufwand aus Nuklidgeneratoren als [^{99m}Tc]-Pertechnetat gewinnen. Zur Gewinnung von Technetium-99m-Chelaten wird das Pertechnetat durch geeignete Reduktionsmittel (z.B. SnCl_2 , $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, etc.) in eine niedrigere Oxidationsstufe überführt, in welcher das Technetium-99m mit Chelatbildnern oder Proteinen Komplexe bildet. Zur Markierung potentieller Chelatbildner mit Technetium-99m und zur Herstellung von Kits für den klinischen Routinebedarf wurden spezielle Verfahren entwickelt und beschrieben. So lassen sich Proteine direkt über Donor-Gruppen (Amino-, Amid-, Thiol-, etc.) des Proteins (J. Nucl. Med. 1986, 27, 685) oder durch Einführen von Komplexbildnern (US-Patent 4 479 930 und Fritzberg, A. R. et al., J. Nucl. Med. 1986, 27, 957) mit Technetium-99m markieren.

Auch aus der Gruppe zyklischer Amine wurden Komplexbildner entwickelt (Troutner, D. E. et al.; J. Nucl. Med. 1980, 21, 443 und Mäcke, H.; DE-3 911 816), Cyclame (Ketring, A. R.; Troutner, D. E. et al.; J. Nucl. Med., 1980, 21, 443-448, Int. J. Nucl. Med. Biol. 1984, 11, 113, Volkert et al., Applied Radiat. Isot., 1982, 33, 891-896), N_2O_2 -Systeme (Pillai, M. R. A.; Troutner, D. E. et al.; Inorg. Chem. 1990, 29, 1850) und ebenso wurden N_2S_2 -Systeme (Bormans, G. et al.; Nucl. Med. Biol. 1990, 17, 499) und N_3S -Systeme (Fritzburg, A.; EP-A-0 173 424 und EP-A-0 250 013) beschrieben.

Alle diese Komplexbildner haben jedoch erhebliche Nachteile. So sind für die Markierung der Cyclame als auch literaturbekannter N_2O_2 -Systeme (Pillai, M. R. A. et al.; Inorg. Chem. 1990, 29, 1850-1856) pH-Werte von 10-13 erforderlich. Ferner verfügen diese System nicht über reaktive Gruppen, die eine Verknüpfung mit Biomolekülen bzw. Proteohormonen ermöglichen. N_2S_2 - und N_3S -Systeme haben zwar in einzelnen Fällen eine hinreichende Stabilität, sind aber lediglich für einfache Ausscheidungsstudien, wie der Harnausscheidung, EP-A-0 250 013, geeignet. Bemühungen, die Herstellung des literaturbekannten MAG_3 (EP-A-0 250 013), welches zur Markierung ein Erhitzen auf 100°C verlangt (Bannister, K. M. et al.; J. Nucl. Med. 1990, 31, 1568-1573) zu vereinfachen, sind zwar im Gange (WO-91-16076), aber bis heute ohne klinischen Zugang geblieben.

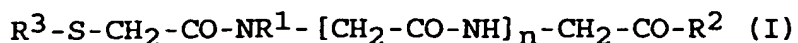
Für N_2S_2 -Komplexe (Bormans, G. et al.; Nucl. Med. Biol. 1990, 17, 499) ist die Haltbarkeit zwischen Zubereitung und Verabreichung geringer als 1 h und bedeutet so einen empfindlichen Nachteil. Auch hier sind daher - bisher ohne klinische Relevanz - Bemühungen im Gange, Mängel zu beheben (Merryn, W. et al., Applied. Radiat. Isot. Vol. 42 (7), 607-612).

Die bisher bekannt gewordenen Komplexbildner haben jeweils eine einheitliche Struktur und sind daher auch diagnostisch nur für einen Zweck anwendbar. Die Molekül-
5 variationen sind auf Substituenten des Grundgerüsts beschränkt und ermöglichen daher keine breite medizinische Anwendung, wie sie bei einer Komplexvariation möglich wäre. Sie sind daher kostenträchtig in Herstellung und wissenschaftlicher Durchdringung der einzelnen Kom-
10 plexe.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, kurzkettige N-Alkyl-Peptid-Chelatbildner, die in einem breiten pH-Bereich bei Raumtemperatur mit Technetium und Rhenium
15 komplexieren, wobei sowohl ionische als auch nicht ionische Komplexe gebildet werden und somit Verbindungen bereitzustellen, welche die Nachteile bekannter ^{99m}Tc - und $^{180,188}\text{Re}$ -Komplexe nicht aufweisen.

Dabei müssen gleichzeitig die Voraussetzungen für die Anwendung dieser Verbindungen am Menschen im Hinblick auf Strahlendosis, Stabilität und Löslichkeit erfüllt sein; es muß gleichzeitig ein möglichst einfaches Verfahren zu deren Darstellung geschaffen werden und eine
20 Kit-Formulierung dieser erfindungsgemäßen Verbindungen/Konjugate und ihrer Metallkomplexe für ihre klinische Anwendung bereitgestellt werden.
25

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß
30 Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

35

n eine Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet,

5 R^1 einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, welcher gegebenenfalls durch ein bis drei Sauerstoffatome unterbrochen oder substituiert ist, und welcher gegebenenfalls eine endständige -COOH-, -OH- oder -NH₂-Gruppe trägt, welche gegebenenfalls mit Glykolsäure oder Glykolsäureestern oder -ethern verestert oder verethert ist,

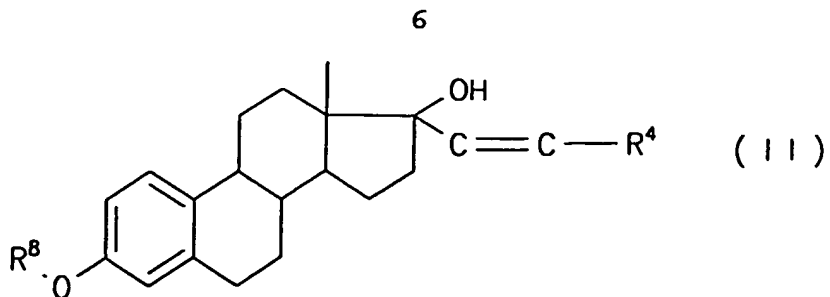
10 wobei die Ester oder Ether mit Carbonsäuren oder Alkoholen mit bis zu 18 Kohlenstoffatomen gebildet werden,

oder einen Phenyl- oder Cyclohexylrest darstellt, welcher gegebenenfalls in der 4-Position mit einer COOH-, NH₂- oder OH-Gruppe, welche gegebenenfalls mit Carbonsäuren
15 oder Alkoholen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen verestert, verethert oder amidiert ist oder einem Halogenatom substituiert ist,

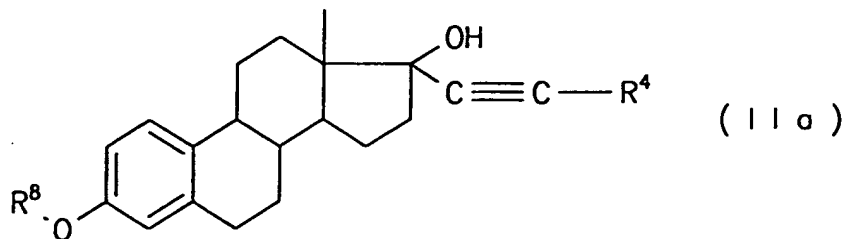
20 R^2 ein Halogenatom, eine Halogenmethyl-, Methyl-carboxyl-, Trifluormethylcarboxyl-, eine NH₂- oder eine OH-Gruppe darstellt,

wobei die im Falle von $R^2 = OH$ gebildete Carboxyl-Gruppe entweder unmittelbar oder nach Veresterung mit einer α,ω -Hydroxycarbonsäure mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen über deren endständige Carboxyl-Gruppe mit
25 einem Biomolekül, einem Steroid, einem Ergolinderivat, einem Benzodiazepinderivat, einem Cholecystokinin, einem Peptid, einem Protein, einem Proteohormon, einem Aminozyucker, einem Endothelin, einem Endothelin-Derivat, einem Endothelin-Antagonisten oder einem Endothelinfragment verestert oder amidiert ist,
30

ein Rest der allgemeinen Formel II



oder der allgemeinen Formel II a



5

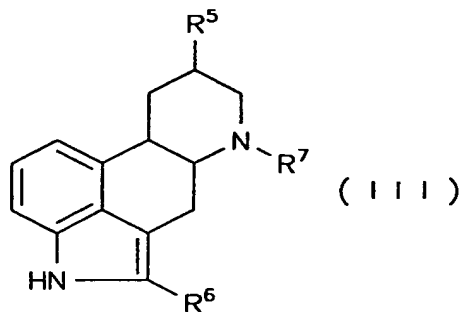
ist, wobei

10 R^4 eine Methylen-, Propenylamino-, Propinylamino-, Methylenamino- oder Methylenoxygruppe und

R^8 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe bedeutet,

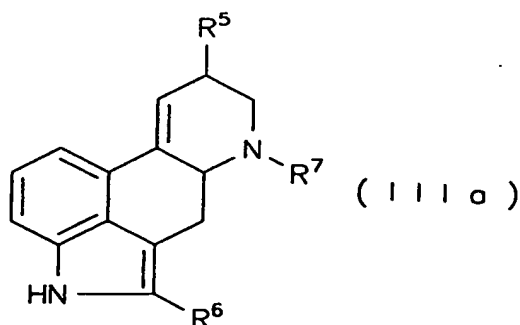
15

einen Rest der allgemeinen Formel III



20 oder der allgemeinen Formel III a

7



darstellt, worin

5 R^5 eine -NH-, -NH-CO-N<, -NH-CO-NH- oder Methylenoxygruppe,

R^6 ein Wasserstoffatom, ein Halogenatom oder eine Methylgruppe und

10

R^7 ein Wasserstoffatom oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen bedeuten,

15 R^3 ein Wasserstoffatom, eine Acetyl-, Benzoyl-, p-Methoxybenzyl-, Acetamidomethyl-, Benzamidomethyl-, Trimethylacetamidomethyl-, Hydroxyacetyl-, Ethoxyethyl-, Ethylthio-, Trityl- oder eine leicht abspaltbare Schwefelschutzgruppe bedeutet

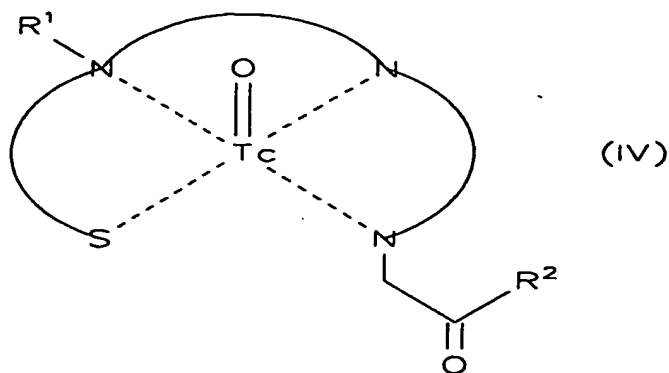
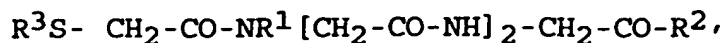
20

und deren Salze mit pharmazeutisch annehmbaren Säuren oder Basen zur Verfügung gestellt werden.

Überraschenderweise wurde eine Verbindungsklasse gefunden, welche nicht nur die genannten Nachteile vermeidet, sondern als $^{99m}\text{Tc}+5$ -Komplexe einen Übergang vom $\text{N}_3\text{S} \rightarrow \text{N}_2\text{SO} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{S}_2$ -N-Alkyl-Peptid-Komplexsystem aufweist und daher in großer Breite als Komplexbildner eingesetzt werden kann.

30

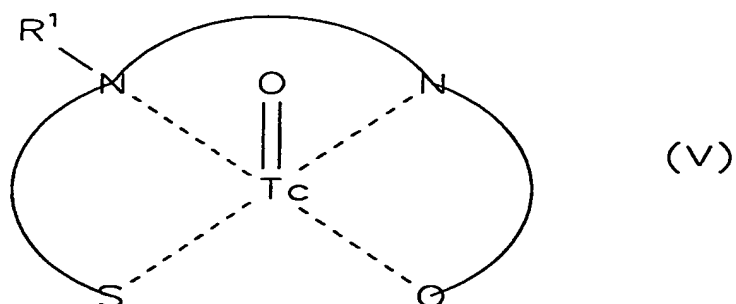
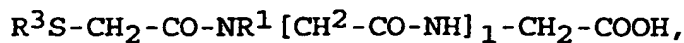
Die Formel IV zeigt einen N_3S -N-Alkyl-Peptid-Komplex im ^{99m}Tc -Core (neutral) aus



5

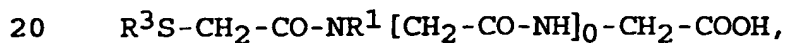
die Formel V einen N_2OS -N-Alkyl-Peptid-Komplex im ^{99m}Tc -Core (neutral) aus

10

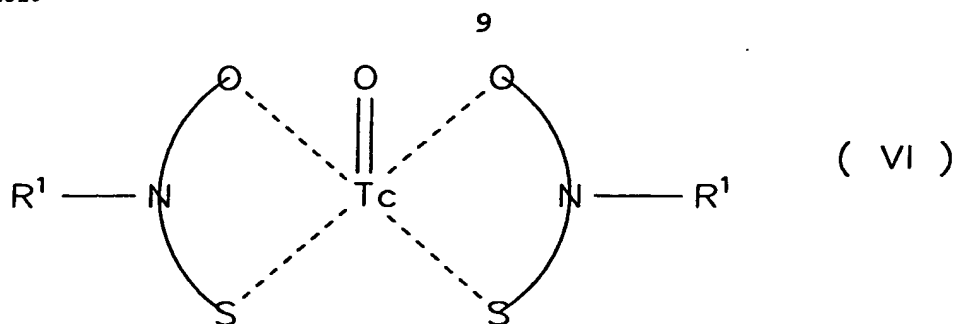


15

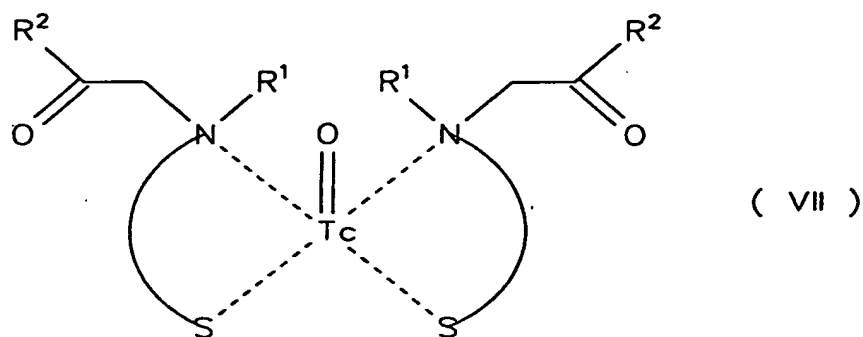
die Formel VI einen O_2S_2 -N-Alkyl-Peptid-Komplex im ^{99m}Tc -Core (mit negativer Ladung) aus



20



und die Formel VII zeigt schließlich einen N₂S₂-N-Alkyl-
 5 Peptid-Komplex in ^{99m}Tc-Core (mit positiver Ladung) aus
 R³S-CH₂-CO-NR¹[CH₂-CO-NH]₀-CH₂-CO-R².



10

Die bei der Molekülvariation entstehenden Komplexe zeigen
 eine überraschende Breite und Übereinstimmung im Hinblick
 auf ihr biologisches Verhalten. So sind Verbindungen
 dieses Typs, gekoppelt an einen Bioliganden, verwendbar
 15 zur Rezeptordarstellung, was bisher für
^{99m}Tc-Verbindungen nicht beschrieben wurde und hervor-
 ragend geeignet zur Darstellung von Plaques bei Gefäß-
 läsionen und der Messung der Nierenfunktion, wobei die
 Verbindungen jeweils an bioaktive Liganden gekoppelt sein
 20 können.

Bevorzugt sind Verbindungen, bei denen R¹ eine -CH₂-
 (CH₂)_m-CH₃-Gruppe mit m = 1 - 14 darstellt

oder R^1 eine Phenyl-, eine p-Phenylamin-, eine Cyclohexylamin-, p-Hydroxyphenyl-, 4-Hydroxycyclohexyl, p-Halogenphenyl- oder 4-Halogencyclohexyl-Gruppe ist.

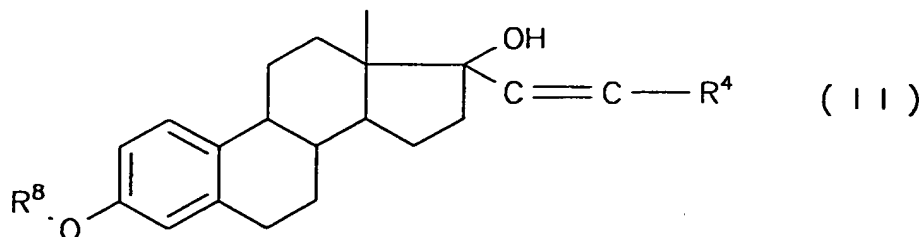
- 5 Bevorzugt sind außerdem Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin

R^1 gleich $-(CH_2)_q-OOC-CH_2-OOC-(CH_2)_r-CH_3$ ist,

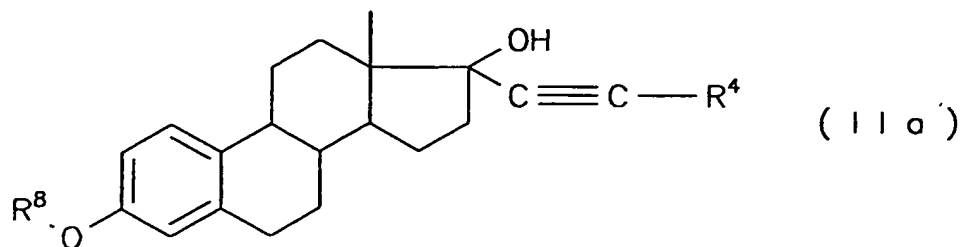
- 10 wobei q und r jeweils ganze Zahlen von 1 bis 16 bedeuten.

- Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin R^1 ein geradkettiger oder verzweigter Akylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen oder ein p-Bromphenylrest ist.
- 15

Ferner sind Verbindungen der allgemeinen Formel I bevorzugt, bei denen R^2 ein Rest der allgemeinen Formel II



oder der allgemeinen Formel II a



ist, wobei

R⁴ eine Methylen-, Propenylamino-, Propinylamino-, Methylenamino- oder Methylenoxygruppe und

5 R⁸ ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe bedeutet.

Von diesen Steroiden sind 17 α -Ethinyl-Estradiole oder deren 3-Methyl-Ether bevorzugt.

10 Eine 17 α -Ethinylgruppe des Estradiols kann auch gekoppelt sein mit einem Ethen. Die Reihenfolge der Ethin- und Ethengruppen ist austauschbar; auch eine Verdopplung der Ethin- oder Ethengruppe ist zweckmäßig. Wichtig ist ein Mindestabstand zwischen Chelator und Estradiolmolekül,
15 bevorzugt eine starre Ethin- oder Ethen-Gruppe, so daß keine Faltung der Seitenkette eintreten kann.

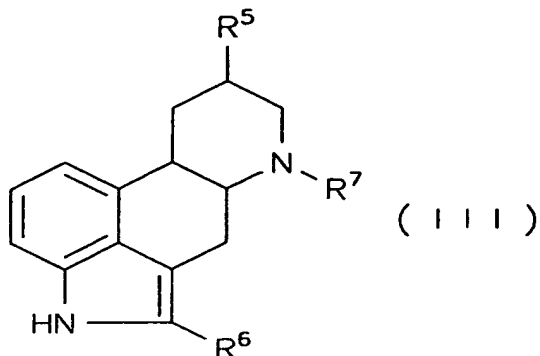
Erfolgt die Bindung von I in dieser bevorzugten 17 α -Position des Estradiolgerüsts, ist bei den erhaltenen Chelat-Komplex-Bioligand-Verbindungen keine oder nur eine
20 geringe Abnahme der biologischen Aktivität zu erwarten, wie es z. B. in Epperly, M. W. et al [J. Steriod Biochem. Molec. Biol. Vol. 39, No. 5A, 729-734, 1991] belegt wird.

25 Die hervorragende Bedeutung dieser Estrogen-Chelat-Komplexe liegt in ihrer Eigenart, die Zellwand zu durchdringen und sich an den Estrogen-Rezeptor anzulagern. Dies gilt insbesondere für Komplexbildner gemäß der allgemeinen Formel I, bei denen n = 2 ist. Bei ^{99m}Tc⁺⁵ sind diese
30 N₃S-Komplexe als Folge der N¹-Alkylierung im Tc-Core neutral (vgl. Formel IV). Während geladene Komplexe die Zellwand nicht zu durchdringen vermögen, z. B. N₃S-Komplex als Steroid 17 α -ethinyl-Chelat, vom Typ Thioacetyl-glycyl-glycyl-glycyl-0-Ester (eigene Versuche), durch-
35 dringen die erfindungsgemäßen N¹-alkylierten Komplexe (N¹ = methyl) die Zellwand und reichern sich nach i. v.

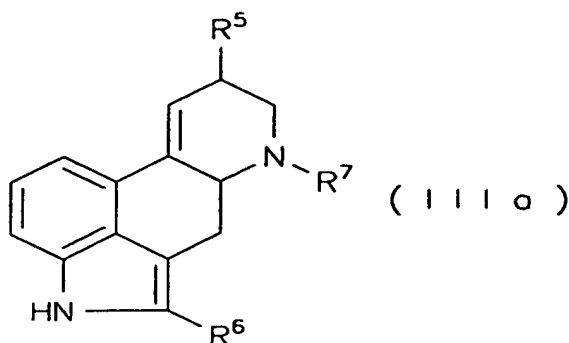
Injektion im Uterus an. Die Anreicherung beträgt, ausgedrückt als Quotient zwischen Blut/Uterus, 0,2 und läßt sich in Abhängigkeit von der N¹-Alkyl-Kettenlänge bzw. Substituenten variieren. Damit wird eine Mamma-ca Früherkennung nach dem SPECT-Verfahren möglich. Besonders bevorzugt ist hier die Verbindung gemäß Beispiel 10.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, bei denen R² ein Rest der

allgemeinen Formel III



oder der allgemeinen Formel III a



ist, wobei

R⁵ eine -NH-, -NH-CO-N<, -NH-CO-NH- oder Methylenoxygruppe,

R^6 ein Wasserstoffatom, ein Halogenatom oder eine Methylgruppe und

- 5 R^7 einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen darstellen.

Diese Verbindungen der allgemeinen Formeln III und III a sind Ergolin-Derivate.

10

- Von diesen Ergolinen wird das 8 α -Amino-6-Methyl-Ergolin ggf. mit Alkyl-Substituenten in 2- und/oder 6-Position mit einer Kettenlänge von C_1 in 2 Position oder C_{1-3} in Position 6 und/oder einem Methyl- bzw. Halogensubstituenten in Position 2 bevorzugt. Der Substituent in 8-Position des Ergolins kann außer αNH_2 auch $\beta -CH_2O-$ oder $\alpha NH-CO-N<$ oder $\alpha NH-CO-NH-$ sein.
- 15

- 20 Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I tragen am endständigen Schwefelatom einen Rest R^3 . Dieser Rest R^3 stellt eine Schwefelschutzgruppe dar, welche während der Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I erforderlich ist. Eine solche Schutzgruppe muß leicht abspaltbar sein. Geeignete Rest R^3 sind beispielsweise Acetyl-, Benzoyl-, p-Methoxybenzyl-, Acetamidomethyl-, Benzamidomethyl-, Trimethylacetamidomethyl-, Hydroxyacetyl-, Ethoxyethyl- oder Trityl-Gruppen. Besonders bevorzugt ist die Benzyolgruppe.
- 25
- 30

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner die Metallchelatkomplexe radioaktiver Metallionen mit den erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin R^1 , R^2 und R^3 die oben angegebene Bedeutung haben.
- 35

Geeignete radioaktive Metallionen sind beispielsweise Ionen der Radioisotope der Elemente Tc, Re, Cu, Ga, Gd, Y und In. Die Auswahl des Radionuklids richtet sich nach der gewünschten Art der Anwendung der erfindungsgemäßen Metallchelatkomplexe der allgemeinen Formel I.

Dabei werden für die Radiodiagnostik oder Radiotherapie unterschiedliche Radionuklide verwendet.

10 Bevorzugt werden dabei radioaktive Metallionen der Isotope der Elemente Tc und Re.

Besonders bevorzugt ist das Radioisotop Technetium-99m.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Konjugate, enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel I oder Metallchelatkomplexe radioaktiver Metallionen der Elemente Tc, Re, Cu, Ga, Gd, Y und In mit Verbindungen der allgemeinen Formel I und sich selektiv in erkrankten Geweben oder in Tumoren anreichernde Substanzen, wobei

20 zwischen diesen eine kovalente Bindung besteht und diese im Falle von Carboxy- oder Aminogruppen enthaltenden Substanzen wie Peptiden, Proteinen, Antikörpern oder deren Fragmenten, amidisch oder im Falle von Hydroxygruppen enthaltenden Substanzen wie Fettalkoholen, esterartig

25 oder im Falle von Aldehydgruppen enthaltenden Substanzen imidisch vorliegt.

Bevorzugt sind Konjugate mit sich in erkranktem Gewebe anreichernden Peptiden wie Endotheline, Teilsequenzen von Endothelinen, Endothelin-Analoga, Endothelin-Derivate oder Endothelin-Antagonisten.

Insbesondere bevorzugt sind solche Konjugate mit den Verbindungen der allgemeinen Formel I und sich selektiv

in erkranktem Gewebe anreichernden Peptiden, wobei die Peptide die folgenden Sequenzen

5

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

10

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

15

Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

20

Cys-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

25

Cys-Ser-Cys-Asn-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

30

Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Asn-
Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp,

35

Ala-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

40

Ala-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

45

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

50

Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

5

N-Acetyl-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-
Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

10

oder die Teilsequenz

His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp

15

oder die cyclischen Aminosäuresequenzen

Cyclo-(DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu),

Cyclo-(DGlu-Ala-alloDIle-Leu-DTrp)

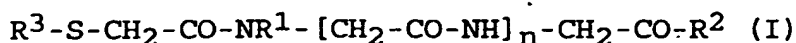
20

aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen

25

Verbindungen der allgemeinen Formel I



30

worin

n eine Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet,

35

R¹ einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit
1 bis 20 Kohlenstoffatomen, welcher gegebenenfalls
durch ein bis drei Sauerstoffatome unterbrochen oder
substituiert ist, und welcher gegebenenfalls eine end-
ständige -COOH-, -OH- oder -NH₂-Gruppe trägt, welche

gegebenenfalls mit Glykolsäure oder Glykolsäureestern
oder -ethern verestert oder verethert ist,

wobei die Ester oder Ether mit Carbonsäuren oder
Alkoholen mit bis zu 18 Kohlenstoffatomen gebil-

5 det werden,

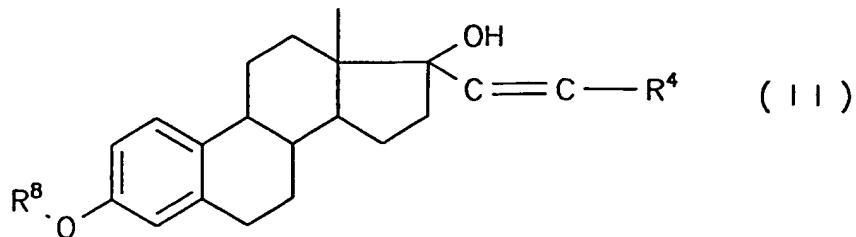
oder einen Phenyl- oder Cyclohexylrest darstellt, wel-
cher gegebenenfalls in der 4-Position mit einer COOH-,
NH₂- oder OH-Gruppe, welche gegebenenfalls mit Carbon-
säuren oder Alkoholen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen
10 verestert, verethert oder amidiert ist oder einem Ha-
logenatom substituiert ist,

R² ein Halogenatom, eine Halogenmethyl-, Methyl-
carboxyl-, Trifluormethylcarboxylgruppe, eine NH₂-
15 oder eine OH-Gruppe darstellt,

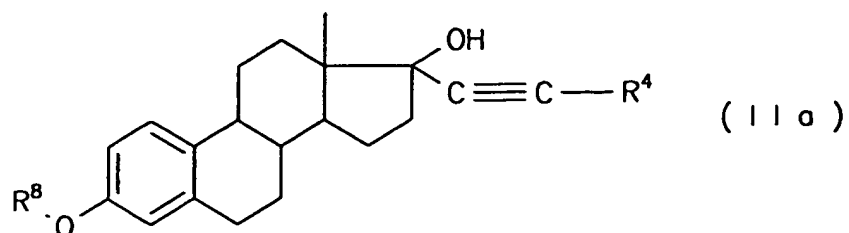
wobei die im Falle von R² = OH gebildete
Carboxyl-Gruppe entweder unmittelbar oder nach
Veresterung mit einer α,ω -Hydroxycarbonsäure mit
bis zu 8 Kohlenstoffatomen über deren endständi-
20 ge Carboxyl-Gruppe mit einem Biomolekül, einem
Steroid, einem Ergolinderivat, einem Benzodia-
zepinderivat, einem Cholecystokinin, einem Pep-
tid, einem Protein, einem Proteohormon, einem
Aminozucker, einem Endothelin, einem Endothelin-
25 Derivat, einem Endothelin-Antagonisten oder ei-
nem Endothelinfragment verestert oder amidiert
ist,

ein Rest der allgemeinen Formel II

30



oder der allgemeinen Formel II a



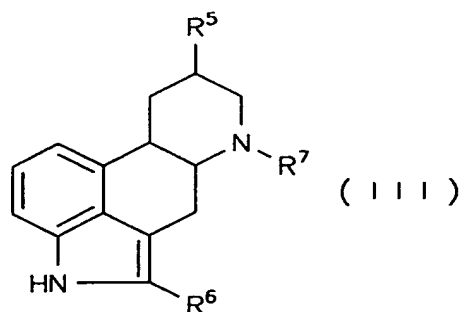
5 ist, wobei

R^4 eine Methylen-, Propenylamino-, Propinylamino-, Methylenamino- oder Methylenoxygruppe und

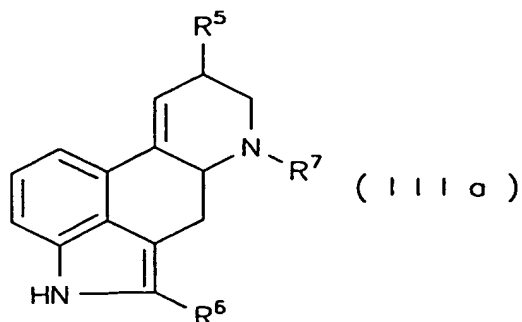
10 R^8 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe bedeutet,

einen Rest der allgemeinen Formel III

15



oder der allgemeinen Formel III a



20

darstellt, worin

R^5 eine -NH-, -NH-CO-N<, -NH-CO-NH- oder Methylenoxygruppe,

5

R^6 ein Wasserstoffatom, ein Halogenatom oder eine Methylgruppe und

10

R^7 ein Wasserstoffatom oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen bedeuten,

15

R^3 ein Wasserstoffatom, eine Acetyl-, Benzoyl-, p-Methoxybenzyl-, Acetamidomethyl-, Benzamidomethyl-, Trimethylacetamidomethyl-, Hydroxyacetyl-, Ethoxyethyl-, Ethylthio-, Trityl- oder eine leicht abspaltbare Schwefelschutzgruppe bedeutet

20

und deren Salze mit pharmazeutisch annehmbaren Säuren oder Basen

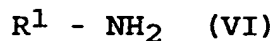
welches sich dadurch auszeichnet, daß man

25

- a) ein Diketopiperazinderivat des Glycins oder
- b) Glycin

30

mit einem Halogencarbonsäurehalogenid und anschließend mit einem Alkylamin oder Arylamin der allgemeinen Formel VI



35

wobei R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, umgesetzt, erneut mit einem Halogencarbonsäurehalogenid umgesetzt und anschließend mit einer Verbindung der allgemeinen Formel IV



wobei R^3 die oben angegebene Bedeutung hat,

5

umsetzt

oder eine Verbindung der allgemeinen Formel V

10



wobei R^2 die oben angegebene Bedeutung hat, mit einem Halogencarbonsäurehalogenid und anschließend mit einem Alkylamin oder Arylamin der allgemeinen Formel VI

15



wobei R^1 die oben angegebene Bedeutung hat, umsetzt, erneut mit einem Halogencarbonsäurehalogenid umsetzt und anschließend mit einer Verbindung der allgemeinen Formel IV

20



wobei R^3 die in oben angegebene Bedeutung hat, umsetzt und diese Verbindungen gegebenenfalls mit einer pharmazeutisch annehmbaren Säure oder Base in deren Salz überführt.

25

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I lassen sich auch derart herstellen, daß man ausgehend von einer erfindungsgemäßen Verbindung der allgemeinen Formel I, wobei n 0 oder 1 ist, diese mit einer Verbindung umsetzt, welche endständige Gruppen aufweist, und dadurch nach der Kopplung an die oben genannte Verbindung einen Rest R^2 bildet. Dabei werden erfindungsgemäße

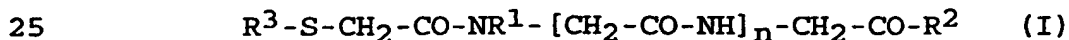
30
35

Verbindungen der allgemeinen Formel I gebildet, bei denen n 1 oder 2 ist. Dies bedeutet, daß ein Teil der Kette der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I durch den angekoppelten Rest R² zur Verfügung gestellt wird.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Metallchelatkomplexe radioaktiver Metallionen mit den erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel I, gegebenenfalls unter vorheriger oder gleichzeitiger Abspaltung des Restes R³ erfolgt in an sich bekannter Weise.

Die Herstellung von Metallchelatkomplexen radioaktiver Metallionen der Elemente Tc und Re mit Verbindungen der allgemeinen Formel I erfolgt dadurch, daß man Technetium-99m oder Re in Form von Pertechnetat oder Perrhenat in Gegenwart eines Reduktionsmittels und gegebenenfalls eines Hilfsliganden mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I



worin R¹, R² und R³ die oben angegebene Bedeutung haben, umgesetzt.

Von besonderer erfinderischer Bedeutung ist nun die überraschende Variabilität der Verbindungen und ihrer Komplexe. Für Verbindungen mit n = 2 gemäß der allgemeinen Formel I erhält man ein N₃S-System. Geht man von n = 2 auf n = 1 über, so kann sich ein N₂SO-N-Alkyl-System mit einer überraschend hohen Komplexstabilität bilden. Schließlich kann sich bei n = 0 aus dem N₁S₁-N-Alkyl-

System beim Komplexieren ein Chelatkomplex, der sowohl ein N_2S_2 -N-Alkyl-System aufzeigt oder aber als weiteres Dimeres ein O_2S_2 -N-Alkyl-Komplex ist, bilden ohne daß eine chemische kovalente Brückenfunktion den Komplex
5 verbindet.

Die neuen Verbindungen haben wegen ihrer chemischen Variabilität und ihrer Varianten in der Komplexbildung auch eine außerordentliche Breite der klinischen Anwen-
10 dung.

Bis heute gibt es keine Methode, die - in vivo - die Bildung von Plaques als Beginn einer Atherosklerose bildlich darstellt. Die Atherosklerose ist eine Volks-
15 krankheit und eine Vorstufe einer koronaren Herzerkrankung, an deren Folgen etwa 40 % der Bevölkerung der Industriestaaten sterben. Es ist daher von besonderem Wert, mit einem einfachen Mittel zu einer bildhaften Darstellung der Gefäßläsionen zu gelangen. So können die
20 erfindungsgemäßen N-Alkyl-Chelate zur Früherkennung atherosklerotischer Gefäßerkrankungen verwendet werden.

Der im Tiermodell (Kaninchen der Art WHHL mit künstlich erzeugten atherosklerotischen Gefäßveränderungen: WHHL-
25 Kaninchen weisen aufgrund eines fehlenden oder defekten LDL Rezeptors hohe LDL Spiegel im Blut auf und bilden daher atherosklerotische Gefäßveränderungen aus) erreichte Quotient nach i.v. Gabe von Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel I, wobei R^2 ein Endothelin, eine
30 Teilsequenz von Endothelin, ein Endothelin-Analoga, ein Endothelin-Derivat oder ein Endothelin-Antagonist ist, aus Aktivität im Plaque und unbeschädigten Gefäß, lag bei 1 : 5 (vgl. hierzu Abbildungen 1 und 2).

35 Es war in hohem Maße überraschend, daß trotz der Lipophilie des Komplexes, als Folge der R^1 -Alkylkette mit

einer Kettenlänge von C_6 bereits nach 3 Stunden die Ausscheidung soweit erfolgt war. Die Läsionen im Bereich der Aorta sind autoradiographisch überraschend gut darstellbar. Hier liegt eine durch die Fettähnlichkeit der Moleküle gegebene Affinität zu den Plaques oder deren Rezeptoren vor, die so hoch ist, daß trotz abfallender Konzentration der Verbindung im Blut - als Folge der Ausscheidung via Leber - die Haftung an den Plaques erhalten bleibt.

10

Die Affinität zu Plaques bei atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße läßt sich durch die Variation der R^1 -Alkyl-Gruppe beeinflussen. So läßt sich über die Eigenart des in R^1 befindlichen Restes die Lipophilie steuern, und gleichzeitig bietet R^2 als freie Carboxylgruppe die notwendige Voraussetzung für eine gute Wasserlöslichkeit. Anstelle von R^2 als freie Carbonsäure kann aber auch eine Amidierung dieser Carboxylgruppe mit einem Aminokohlenwasserstoff zur Wasserlöslichkeit beitragen.

20

Es ist bekannt, daß Proteine, insbesondere kurzkettige Proteohormone wie Endotheline, beim Ankoppeln eines Chelators über eine kovalente Bindung ihre Wirksamkeit verlieren. Völlig unerwartet war daher das Verhalten der erfindungsgemäßen Verbindungen bei der kovalenten Bindung an Endotheline, deren Antagonisten oder Fragmente (Beispiel 11, 12).

25

Die hier gezeigte Art der Generierung der erfindungsgemäßen N-Alkyl-Komplexbildner der allgemeinen Formel I mit Endothelinen (Beispiel 11 und 12) aus Chelatbildungsvorstufen ist eine neue Methode zur Generierung von solchen Komplexbildungsstellen. Die Stabilität der neuen N-Alkyl-Komplexe der allgemeinen Formel I entspricht den bekannten N_3S -Komplexen.

35

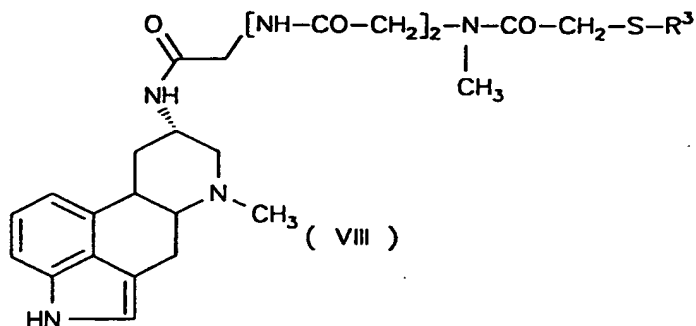
Nicht-invasive Techniken zur Diagnose der Atherosklerose wurden beschrieben, insbesondere mit einer Radio-Jod-Markierung. So wurden mit Radioisotopen markierte Antikörper oder auch markierte "Low Density Lipoproteine" (LDL) vorgestellt, die an atherosklerotische Wandbereiche binden (Lees et al. 1983, J. Nucl. Med. 24, 154 -156, Kaliman et al. 1985, Circulation, 72, 300; Virgolini et al. 1991, Eur. J. Nucl. Med., 18, 944-947). Diese Methoden beinhalten jedoch entscheidende Nachteile, wie z.B. die antigene Wirkung der Antikörper auf den Organismus und die lange Zeitdauer (mehrere Tage), die zur Isolierung, Reinigung und Markierung des LDL aus dem Blut des Patienten benötigt wird. Vor allem aber sind diese großen Moleküle durch eine lange Halbwertszeit im Blut ausgezeichnet, die zusammen mit einer hohen Hintergrundstrahlung im gesamten Körper eine Lokalisation der atherosklerotischen Läsionen erschwert, wenn nicht gar unmöglich macht (Shih et al. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 1436 - 1440), synthetisierten Teilsequenzen des LDL-Proteinanteils (apo-B-100), die zwar noch an die atherosklerotischen Plaques binden, aber sich durch eine weitaus kürzere Halbwertszeit im Blut und ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis hervorheben. Aufgrund einer zu geringen Affinität zum Plaque und/oder der geringen Dichte der Bindungsstellen dieser Peptide im Plaque, konnte auch mit diesen apo-B-Peptiden keine erfolgreiche in vivo Diagnose der Atherosklerose gezeigt werden.

Allgemein ist diesen Verbindungen der Nachteil des radioaktiven Iod-123 zu eigen. Die schlechte Verfügbarkeit wegen der Herstellung im Cyclotron und der physikalischen Halbwertszeit von 13 Stunden, verbunden mit der leichten Abspaltbarkeit im Organismus. So war es überraschend, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Formel I nach kovalenter Bindung an NH-Gruppen des Endothelins und Komplexierung mit ^{99m}Tc eine gute Anreicherung in athero-

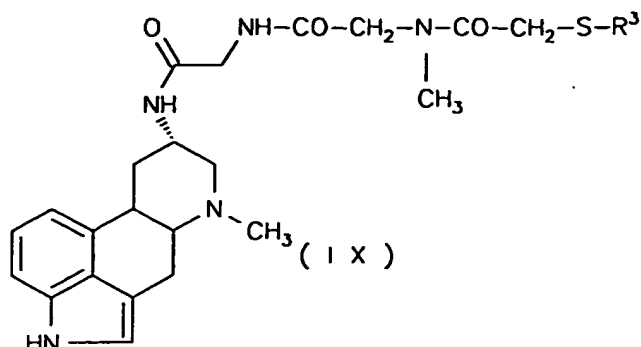
sklerotischen Plaques zeigten. Insbesondere auffallend ist der Vorteil, daß die $n = 1$ und $n = 0$ Verbindungen nach kovalenter Bindung an Endotheline über eine Amidbildung neue N-Alkyl-Peptid-Komplexbildner generieren, ggf. unter Einbeziehung der in geeigneter Position befindlichen NH- und SH-Gruppen des jeweiligen Endothelins.

Bei der Umsetzung der erfindungsgemäßen Verbindungen mit dopaminergen bioaktiven Molekülen geht überraschend die Rezeptoraffinität dieser aus der Ergolinreihe stammenden Verbindungen nicht verloren, sondern es gelang sogar bei Vorstufen - mit oder ohne Affinität zum D_2 -Rezeptor - eine hinreichende Gehirngängigkeit zu erreichen, die eine Darstellung der D_2 -Rezeptoren ermöglicht. Bemühungen, mit $^{99m}\text{Tc}+5$ -Komplexen Rezeptoren im Gehirn darzustellen, sind bis heute ohne Erfolg geblieben. So findet man bei der Umsetzung von 8 α -Amino-6-Methyl-Ergolin mit Mercapto-Acetyl-Glycyl-Glycyl-Glycin zum 8 α -Amid und Komplexbildung mit $^{99m}\text{Tc}+5$ nach i.v. Injektion an der Ratte (Wistar) keine Aufnahme im Gehirn.

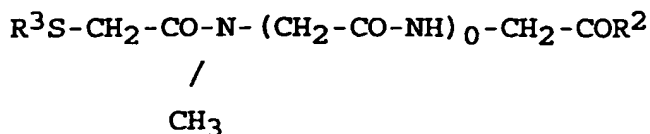
Führt man hingegen die Umsetzung mit den erfindungsgemäßen Verbindungen nach Formel I durch, wobei $R^1 = \text{Methyl}$ ist und die Amidierung oder Veresterung über R^2 erfolgt, so erhält man unter analogen Bedingungen eine Anreicherung im Gehirn von 0,1 bis 0,5 % der Dosis.



- Bei $n = 1$ und $n = 0$ Komplexen bilden sich neue N-Alkyl-Peptid-Komplexstrukturen heraus, die im Zusammenwirken mit dem bioaktiven Molekül, überraschenderweise Strukturen dopaminergischer Verbindungen nachahmen und eine hohe Anreicherung im Gehirn zeigen, die zur Sichtbarmachung der D-Rezeptoren genutzt werden kann (Formel IX).



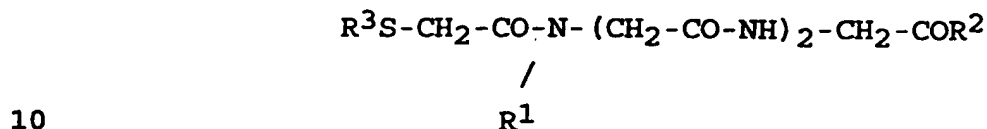
- Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren [A Specialist Periodical Report; Amino-acids, Peptides and Proteins; The Chemical Society, Burlington House, London, W1VOBN]. Zur Herstellung der Verbindungen mit $R^1 = CH_3$ und $R^2 = OH$ geht man vom Sarcosin aus und setzt dieses mit Chloracetylchlorid um. Das entstehende Chloracetylsarcosin wird mit Thiobenzoessäure in üblicher Weise umgesetzt und man gelangt zu Strukturen mit $n = 0$



Verbindung A

Die Herstellung der Verbindungen mit $n = 2$ erfolgt durch Umsetzung des Diketopiperazins des Glycins mit Chloracetylchlorid. Das entstehende Chloracetylglycyl-

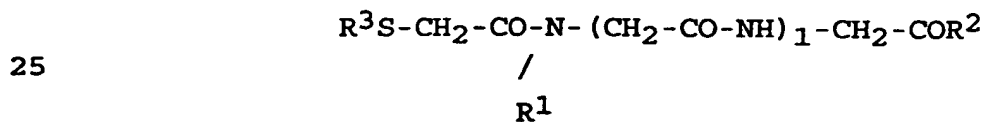
glycin wird anschließend mit N-Methylamin oder zur Einführung längerer Reste mit N-Alkylaminen, Phenylaminen, Alkyl-oxa-alkylaminen, Cycloalkylaminen oder Glycinglycolsäureester umgesetzt. Durch erneutes Umsetzen mit Chloracetylchlorid und anschließende Thiobenzoylierung werden Verbindungen der Formel $n = 2$ erhalten.



Verbindung B

R^1 steht dabei für die Variationen am Sarcosylstickstoffatom

Die entsprechenden Verbindungen mit $n = 1$ erhält man durch Umsetzung von Salzen des Glycins mit N - geschützten Sarcosylverbindungen oder durch Umsetzung von Glycin mit Chloracetylchlorid mit nachfolgender Aminolyse der Chlormethylgruppe. Erneute Reaktion mit Chloracetylchlorid und anschließender Thiobenzoylierung liefert die Titelverbindungen mit $n = 1$.



Verbindung C

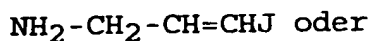
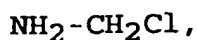
Die Verbindungen A, B, C reagieren in üblicher Weise mit Aminogruppen- oder Hydroxylgruppentragenden Reaktionspartnern. Zu diesem Zweck werden A bis C in N-Methylpyrrolidon gelöst, mit BOP (B. Castro et al. Tetrahedron Letters 14 (1975) 1219) oder TBTU (Knorr et al. Tetrahedron Letters 30 (1989), 1927) voraktiviert und anschließend mit der Aminokomponente umgesetzt. Veresterungen

werden vorzugsweise mit Dicyclohexylcarbodiimid in Gegenwart von Dimethylaminopyridin durchgeführt. Für die Synthese von Verbindungen mit einem Estrogen als Bioligand geht man von einem Estrogen aus, das bereits einen ungesättigten Substituenten in 17 α wie Propargylamin- oder Propargylyalkolholrest trägt und setzt diesen mit einer der Verbindungen A bis C in der beschriebenen Weise um.

Die Umsetzung der Verbindungen A bis C mit Peptiden, insbesondere mit Endothelinbausteinen erfolgt nach in der Peptidchemie gebräuchlichen Methoden entweder konventionell in Lösung, vorzugsweise in Dimethylformamid, Dimethylacetamid, N-Methylpyrrolidon, Dimethylsulfoxid oder Gemischen aus diesen Komponenten. Bei Verwendung der Solid-Phase-Methode kann die Acylierung der Aminokomponente auch unter üblichen Bedingungen am Syntheseharz erfolgen. Abspaltung vom Syntheseharz liefert die gewünschten Verbindungen. Eine präparative Reinigung, falls erforderlich, erfolgt chromatographisch an einer RP 18 Säule in einem Wasser / Acetonitrilgradienten, der 0,1 % Trifluoressigsäure enthält.

Für die Umsetzung mit Aminogruppen- oder Hydroxylgruppen-tragenden Ergolinen wurde analog zu den Umsetzungen mit Peptiden in Lösung verfahren. Die Umsetzungen wurden in N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Die präparative Reinigung erfolgt ebenfalls wie für Peptide angegeben.

Die anderen R⁴-Reste werden nach Aufbau der geschützten Dipeptide A - C erhalten in dem R¹, wobei R² = OH ist, nach Aktivierung mit





umgesetzt wird und nach der Palladium-O-Reaktion das 17 α -
5 Ethinylsteroid mit dem gewünschten Komplexbildner über
eine C-C-Bindung kovalent gebunden wird.

Die Komplexbildung wird bevorzugt in wässrigem Medium,
bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9 und bei Raumtempera-
10 tur, durch Reduktion von Na-Pertechnetat mit z.B.
Zinn(II)chlorid oder Dithionid, ggf. über einen Hilfsli-
ganden wie Natriumcitrat oder Natriumtartrat ausgeführt,
wobei die Schutzgruppe R³ bereits zuvor oder in situ
abgespalten wird.

15 Eine Aktivierung der im Falle von R² = OH entstehenden R²
Carboxylgruppe oder der Ersatz der Carboxylgruppe durch
eine NCS- oder ähnlich reaktive Gruppe führen dazu,
Peptidchelate kovalent an ein größeres Protein oder
20 Proteohormone, Endotheline, Endothelinanaloge, Endothe-
lin-Antagonisten, Endothelinderivate, Teilsequenzen von
Endothelinen zu binden und nachträglich eine Komplexie-
rung durchzuführen.

25 Wie in der Herstellungsvorschrift ausgewiesen, lassen
sich die erfindungsgemäßen ^{99m}Tc- und ^{186,188}Re-Komplexe
bei Raumtemperatur, neutralem bis schwach alkalischem pH
und mit oder ohne Umchelatisierung (z.B. über ein
Heptagluconat-^{99m}Tc-Komplex) in Ausbeuten zu 95 % als
30 Komplexe herstellen. Ihre leichte Salzbildung über ein
freies Kation führen zu einer guten Wasserlöslichkeit.

Herstellung der Metallkomplexe: Die Abspaltung der
Schutzgruppe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden
35 (s. "Protective groups in organic synthesis" T.N. Greene,
John; Wiley and Sons 1981).

Für die Anwendung im humandiagnostischen Bereich werden üblicherweise zwischen 370 MBq und 1850 MBq eingesetzt, bevorzugt 740 bis 1480 MBq. Zur Anwendung am Menschen werden die erfindungsgemäßen Verbindungen in Form eines Kit's bereitgestellt. Der Kit enthält mindestens einen Chelator nach der allgemeinen Formel I in freier oder an Liganden gebundener Form.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Cold-Kit, welches einen Chelatbildner nach der allgemeinen Formel I in freier Form oder an ein bioaktives Molekül, wie z.B. eine Ergolin-, Estradiol- oder Endothelin-Derivat gebunden, enthält und welches in der Lage ist, Metallatome zu binden.

Erhebliche Schwierigkeiten bereitet oft die Abspaltung der intermediär zur Ausführung der Synthese eingeführten Schutzgruppen. Gerade Chelatbildner mit Peptid-Verknüpfungen werden bei der Abspaltung der -S-Schutzgruppe (R^3) durch gleichzeitig ablaufende Spaltung der Peptidkette stark in Mitleidenschaft gezogen bzw. führen zu nicht mehr verwertbaren Bruchstücken, umso überraschender war es, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Wasserstoff/Pd/ $CaCO_3$, also einer Schutzgruppenabspaltung unter hydrierenden Bedingungen, in Gegenwart von dem üblich angewendeten Alkali, eine hohe, bis zu 80 % reichende Abspaltung eintritt.

Diese entscheidende Verbesserung in der Synthese der freien Chelat-Komplexe ist insofern von hoher Bedeutung, als damit eine Schutzgruppenabspaltung vor der Kit-Formulierung erfolgen kann und die Gewinnung des schutzgruppenfreien Chelators technisch erheblich verbessert wird.

Am Beispiel 3 wird die erfindungsgemäße Abspaltungsmethode beschrieben. Während bei der üblichen Abspaltung mit Alkali ein nur schwer zu trennendes Gemisch erhalten wurde, erhielt man bei der Schutzgruppenabspaltung mit Alkali in Gegenwart von Wasserstoff/Pd/CaCO₃ eine ~ 100 %ige Stoffausbeute mit über 80 % an gewünschtem Material.

Beispielhaft sei genannt, daß die Umsetzung mit Aminen bzw. Alkoholen über eine Aktivierung der Carbonsäure R₂ = OH verläuft, wobei dem Fachmann bekannte Methoden angewendet werden.

Als aktivierte Gruppen seien beispielhaft genannt: Säurechloride, gemischte Anhydride [Org. Prep. Proc. Int. 1975, 7, 215], aktivierte Ester [Adv. Org. Chem. Part B, 472]. Die Verknüpfung mit Biomolekülen kann direkt oder auch über Linker erfolgen, hier sei die Carbodiimidmethode (Fieser, Reagents for Organic Synthesis 10, 142) genannt. Die Verknüpfung erfolgt derartig, daß zwischen Chelat und Biomolekül eine kovalente Bindung gebildet wird.

Bei Verwendung von Steroiden als Biomoleküle werden bevorzugt Estradiol Derivate mit Substituenten in 17 α -Position verwendet. Die Synthese solcher Verbindungen wird z.B. von Blickenstaff für 17 α -Ethinyl-Derivate des Estradiols beschrieben. (Blickenstaff A.; Steroids 46, 889 (1985); USP 462.426). Für Estradiol-Derivate mit 17 α -Propargyl-Substituenten mit endständiger NH₂ oder OH-Funktion wird die Synthese von Blickenstaff, Brandes und Poirier beschrieben. (Blickenstaff et al.; Steroids 48, 223 (86); Brandes, A. et al. Dissertation 87-01441, 1986, University of Illinois, D. Poirier et al. J. Steroids. Biochem. Molec. Biol. 38, No. 6, 759-774, 1991).

Eine Übersicht über die Verknüpfung von Dreifach- mit Zweifach-Bindungen, z.B. nach der Palladium-0-Reaktion sind in Aldrichchimica Acta, Vol. 15, No. 1, 1982; Shun-ichi Murahashi et al., Stephen A. Godleski, Tetrahedron Letters, Vol. 22, No. 24, pp 2247-2250, 1981; Tetrahedron Letters, Vol. 29, No. 24, 2973-2976, 1988; beschrieben. Hierbei wird z.B. I mit $R^2 = -NH-CH_2-C\equiv CH$ bei der Kopp-
lung mit z.B. 17 α [2-Halogen-ethenyl]-estradiol gemäß genannter Literaturstellen umgesetzt.

10

Aus der Literatur ist bekannt, daß Ergotalkaloide vom Typ der 6-Methyl-8-substituierter Ergoline über ein breites Spektrum an chemischer Variation verfügen, ohne daß bis heute ein Zusammenhang zwischen Wirkung und Substituenten in Position 8 eindeutig erkennbar wäre [Ergot Alkaloids and Related Compounds, Editors: B. Berde and H.O. Schild, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978].

15

Ein bevorzugter dopaminergener Ligand ist Ergolin. Eine Übersicht über Synthesewege zu 8-substituierten Ergolinen findet man bei Ergot Alkaloids and Related Compounds, Editors B. Berde and H.O. Schild, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1978, Chapter II Chemical Background, J. Ruisemmann and P.A. Stadler.

20

25

Bevorzugt ist die Umsetzung mit dem 8 α -Amino- bzw. 8 β -Hydroxy-Methyl-Ergolin. Sie erfolgt über eine aktivierte Gruppe in R^2 , beispielsweise das mit Benzotriazol-1-yl-tetra-methyl-uronium-tetrafluoroborat oder nach der bekannten Carbodiimidmethode.

30

Bei der erfindungsgemäßen Anwendung der $n = 1$ und $n = 0$ Komplex- bzw. Partialkomplexbildner werden unter Einbeziehung des Stickstoffs in der 8 α -Amino und 6-N-Methyl Gruppe des Ergolins neue Komplexe generiert.

35

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Metallchelate für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke sowie pharmazeutische Mittel, die mindestens ein erfindungsgemäßes Chelat der allgemeinen Formel I, gegebenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen, enthalten.

Zur Anwendung am Menschen werden die erfindungsgemäßen Verbindungen in Form eines Cold- oder Hot-Kit's bereitgestellt. Der Kit enthält mindestens einen Chelator nach Formel I in freier oder gebundener Form, wobei die Liganden bevorzugt aus der Stoffklasse der Ergoline, Estradiole, Endotheline, kurzkettige synthetische Peptide, Cholecystokinine gewonnen werden.

Beispiele

Allgemeine Komplexbildung mit Natrium-Gluconat

^{99m}Tc-Gluconat:
2 ml ^{99m}Tc-Generatoreluat werden zu 2 ml 0,1 M Natriumgluconatlösung gegeben und mit 10 µl 0.01 M SnCl₂ (in 0,01 M HCl) versetzt. Danach erfolgt dünnschichtchromatographische Prüfung der quantitativen Pertechneetatreduktion.
DC (Kieselgel/Aceton): ^{99m}Tc-Gluconat Rf: 0-0.1;
^{99m}TcO₄⁻ Rf: 0,9

Beispiel 1

[^{99m}Tc]-Mercaptoacetyl-Sarkosin

1. Stufe: Chloracetyl-sarkosin:

0,07 mol Sarkosin werden in 50 ml 1N Natronlauge gelöst und bei 0°C portionsweise mit 0,08 mol Chloracetylchlorid

und 110 ml 1N Natronlauge versetzt. Nach 45 min ist die Zugabe beendet und die Reaktionslösung wird mit 20 ml 5N Salzsäure angesäuert.

- 5 Das Produkt wird unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt und der Rückstand mit dreimal je 50 ml kaltem Aceton extrahiert. Das Aceton wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 100 ml Ether extrahiert. Der Ether wird abgedampft und das zurückbleibende
10 Öl mit etwas Ether aufgenommen und unter starkem Rühren zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 77 % d.Th.

DC:

Kieselgel// Butanol/ Eisessig/ Wasser 2:1:1

- 15 Rf: 0,65 (Jodbedampfung)

2. Stufe: Benzoylmercaptoacetyl-sarkosin:

- 0,02 mol Chloracetyl-sarkosin werden in 750 ml Methanol
20 unter Rühren in einer Schutzgas-Atmosphäre bei Raumtemperatur gelöst. Dazu wird langsam eine Lösung von 0,041 mol Thiobenzoessäure, gelöst in 20 ml Methanol und neutralisiert mit Natriummethylat, zugetropft und weitere 12 h gerührt.

25

- Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 2N Salzsäure aufgenommen. Das Reaktionsprodukt fällt als braunes Öl aus, das von der überstehenden Lösung abgetrennt und mit Chloroform extra-
30 hiert wird. Das Chloroform wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether versetzt. Durch Kühlen und intensives Rühren wird das Reaktionsprodukt ausgefällt, abfiltriert und auf dem Tonteller getrocknet.

pH-Titration und IR-Spektrum zeigten, daß das Reaktionsprodukt aus einem Gemisch von 60 % Methylester und 40 % freier Aminosäure bestand.

5 3. Stufe: Abspaltung der Schutzgruppe:

0,08 mmol des erhaltenen Gemisches werden in 2 ml absolutem Methanol suspendiert, mit 2 mg Pd/CaCO₃ (5 %) versetzt und bei einem Wasserstoffdruck von 66 kPa unter
10 Rühren mit einer Lösung von 0,13 mmol Natriummethylat in 1 ml absolutem Methanol umgesetzt. Man rührt noch 15 min und neutralisiert danach die Lösung mit methanolischem Dowex 50WX8. Der Katalysator und das Harz werden abfiltriert, die Substanz lyophilisiert und die Verunreinigungen mit 2 ml Benzol extrahiert. Anschließend wird das
15 Benzol abgetrennt und die Substanz aus Ethanol lyophilisiert.

Das erhaltene Produktgemisch aus Ester und freier Säure
20 wird über Sephadex G10 getrennt. (Säule 14 x 1000, 20 ml/h, RI-Detektor) Mercapto-acetyl-sarkosin-methylester wird als zweite Fraktion abgetrennt, vgl. Beispiel 1 a).

Mercaptoacetyl-sarkosin :

25 DC:

Kieselgel//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

Rf: 0,7 (Ninhydrin)

RP 18/Methanol Rf: 0,85 (Ninhydrin)

¹H-NMR (DMSO) TMS δ2,9 (SH, 1H), δ3,1 (N-CH₃, 3H), δ3,9
30 (-CH₂, 2H)

Markierung von N-Methyl-MAG1

Zu 2 ml ^{99m}Tc-gluconatlösung werden ca. 1 mg N-Methyl-
35 MAG1, gelöst in 200 µl Wasser, gegeben. Nach einer Reak-

tionszeit von 15-20 min erfolgt die Reinheitskontrolle mittels DC auf Kieselgel 60/95 % Ethanol.

Die Hauptmenge der Aktivität läuft mit $R_f = 0.1$ (ca.80%); weitere Peaks bei $R_f = 0.2$ (ca.10%) und $R_f = 0.4$ (ca.10%).

- 5 Im Elektropherogramm wird ein anionischer Tc-MAG1-Komplex nachgewiesen mit einer relativen Beweglichkeit $u_{\text{Pertechn.}} / u_{\text{TcMAG1}}$ von 0,2.

Beispiel 1 a:

10

Bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches aus Beispiel 1, Stufe 3 erhält man 20 % Mercapto-acetyl-sarkosin-methylester als farbloses Öl.

- 15 Beispiel 2

Mercapto-acetyl-hexylaminoessigsäure

1. Stufe: Hexylaminoessigsäure

20

0,021 mol Chloressigsäure werden mit 0,1 mol Hexylamin versetzt und 5 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird der dicke Sirup in 500 ml Aceton eingerührt und kristallisiert in Form von weißen Blättchen aus.

- 25 Ausbeute 2,1 g (63 % d.Th.)

DC:

Kieselgel//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

R_f : 0,6 (Ninhydrin)

30

2. Stufe: Chloracetyl-hexylaminoessigsäure:

- 35 0,01 mol Hexylaminoessigsäure werden in 10 ml 1N Natronlauge gelöst, gekühlt und bei 0°C abwechselnd mit 1,5 ml (1 ml = 0,012 mol) Chloracetylchlorid und 20 ml 1N Na-

tronlauge versetzt. Nach 30 min ist die Reaktion beendet und es wird noch 30 min unter leichter Erwärmung nachgerührt. Mit 3 ml 5N Salzsäure wird angesäuert und das ausfallende braune Öl abgetrennt.

5

Das Öl wird mehrfach mit heißem Wasser extrahiert und als farbloses Öl ohne weitere Reinigung für die nächste Synthesestufe eingesetzt.

10

DC:

Kieselgel//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

Rf: 0,75 (Jodbedampfung)

3. Stufe: Benzoylmercaptoacetyl-hexylaminoessigsäure:

15

0,018 mol Chloracetyl-hexylaminosäure werden in 500 ml Methanol unter Stickstoff gerührt. 0,036 mol Thiobenzoesäure werden mit Natriummethylat neutralisiert und innerhalb von 30 min zu der Lösung gegeben. Es wird noch weitere 12 h unter Schutzgas gerührt. Das Methanol wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit 2N Salzsäure angesäuert und das ausfallende gelbe Öl abgetrennt.

20

Ausbeute: 370 mg

25

DC:

Kieselgel//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

Rf: 0,5

Beispiel 3

30

[^{99m}Tc] Mercaptoacetyl-sarkosyl-diglycin

1. Stufe: Chloracetyldiglycin:

35

10 g Glycinanhydrid werden in einem 250 ml Dreihalskolben in 50 ml 2N Natronlauge bei Raumtemperatur gelöst. Nach

- 45 min wird die Lösung auf 0 °C abgekühlt und 11,1 g Chloracetylchlorid und 24 ml 5N Natronlauge abwechselnd unter fortgesetztem Rühren und Kühlen zugetropft. Nach 45 min ist die Zugabe beendet. Anschließend werden 40 ml 5N Salzsäure zugegeben, wobei sich die Lösung entfärbt und die Substanz zu kristallisieren beginnt. Man läßt sie noch ca. 1 h bei 0 °C stehen und saugt ab. Er wird mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und aus heißem Wasser umkristallisiert.
- 10 Ausbeute: 5 g

- Die Mutterlauge wird unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Niederschlag wird aus Wasser umkristallisiert.
- Ausbeute: 2,5 g
- 15 Schmp.: 173 °C
- DC: Kieselgel//n-Butanol/Eisessig/Wasser/ 4:1:1
- Rf: 0,75 (Jodbedampfung)
- IR (fest in KBr):
- $\nu_{\text{C=O}}$ 1636, 1676; δ_{NH} 1550; ν_{COOH} 1708 cm^{-1}

- 20 2. Stufe: Sarkosyl-diglycin

- 5 g Chloracetyldiglycin werden mit 15 ml 33 %iger wäßriger Methylaminlösung versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Lösung auf Sirupdicke unter vermindertem Druck eingeeengt, der Sirup auf dem Wasserbad erwärmt und mit 50 ml heißem Ethanol versetzt. Den Niederschlag läßt man in der Kälte absetzen und saugt über eine G4-Fritte ab. Er wird in 43 ml heißem Wasser gelöst und 43 ml heißes Ethanol zugegeben. Das Produkt kristallisiert aus, man saugt ab und lyophilisiert.
- 25 Ausbeute: 3 g = 60 % d. Th.
- Schmp.: 237 °C
- 35 DC: Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser/ 4:1:1
- Rf: 0,3 (Ninhydrin)

IR (fest in KBr):

$\nu_{\text{C=O}}$ 1620, 1650, δ_{NH} 1540; ν_{COOH} 1672 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) TMS δ 2,8 (N-CH₃, 3H), δ 3,8-4,1 (-CH₂-, 6H)

5 3. Stufe: Chloracetyl-sarkosyl-diglycin:

2 g Sarkosyl-diglycin werden in 10 ml 1N NaOH bei Raumtemperatur gelöst und dann bei 0°C unter Rühren abwechselnd mit 1 ml Chloracetylchlorid und 16 ml 1N NaOH
10 innerhalb von 30 min versetzt. Man läßt weitere 30 min rühren, säuert mit 3 g 5N HCl an und engt das Produkt unter vermindertem Druck bis zur Trockne ein. Die dabei anfallenden Kristalle werden in heißem Wasser gelöst und die Lösung mit Ethanol versetzt. Vom ausgefallenen Natriumchlorid wird abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeengt. Durch mehrmaliges Behandeln mit
15 jeweils 30 ml heißem Aceton wird das gewünschte Produkt extrahiert, das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.
20

Ausbeute: 1,1 g = 53 % d. Th.

Schmp.: 74 °C

DC: Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1

Rf: 0,7 (Jodbedampfung)

25 IR (fest in KBr):

$\nu_{\text{C=O}}$ 1655; δ_{NH} 1550; ν_{COOH} 1730 cm^{-1}

30 4. Stufe: Benzoylmercaptoacetyl-sarkosyl-diglycin:

1 g Chloracetyl-sarkosyl-diglycin wird in 140 ml Methanol, p.a., unter Rühren und unter Schutzgas bei Raumtemperatur gelöst.

35 In einem Erlenmeyerkolben werden 0,8 g Thiobenzoessäure in 3 ml Methanol gelöst und mit Natriummethylat neutrali-

siert. Diese Lösung wird unter Rühren und unter Schutzgas-Atmosphäre langsam zur Ausgangslösung zugetropft und noch weitere 12 Stunden gerührt. Man entfernt unter vermindertem Druck das Lösungsmittel und nimmt den Rückstand mit 2N HCl auf. Es wird abgesaugt und mit warmen Wasser neutral gewaschen. Anschließend wäscht man noch mit 20 ml Chloroform, 20 ml Acetonitril und 20 ml Ether und trocknet den Rückstand unter vermindertem Druck.

Ausbeute: 0,83 g = 61 % d.Th.

Schmp.: 134 °C

DC: Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1

Rf: 0,8 (Jodbedampfung)

IR (fest in KBr): $\nu_{C=O}$ 1620; δ_{NH} 1550 cm^{-1} , ν_{COOH} 1720 cm^{-1}

5. Stufe: Mercaptoacetyl-sarkosyl-diglycin

Alkalische Abspaltung der Schutzgruppe:

Die Abspaltung der Schutzgruppe nach dem üblichen Verfahren mit Natriummethylat führte zu einem stark verunreinigten Endprodukt. Das Mercaptoacetyl-sarkosyl-diglycin ist nur zu etwa 25 % enthalten. Neben einem nicht identifizierten Nebenprodukt entstehen bei dieser Verseifung in der Hauptsache Mercaptoacetyl-sarkosin und Diglycin. Das gewünschte Produkt wird nur in geringer Ausbeute erhalten.

Alkalische Abspaltung unter Hydrierbedingungen:

0,08 mmol Substanz werden in 2 ml wasserfreiem Methanol suspendiert, mit 2 mg Pd/CaCO₃ (5 %) versetzt und bei einem Wasserstoffdruck von 60 kPa unter Rühren mit einer Lösung von 0,13 mmol Natriummethylat in 1 ml wasserfreiem Methanol umgesetzt. Man rührt noch 15 min und neutralisiert danach die Lösung mit methanolischem Dowex 50WX8. Der Katalysator und das Harz werden abfiltriert, die Substanz lyophilisiert und mit 2 ml Benzol extrahiert.

Anschließend wird das Benzol abgetrennt und die Substanz aus Ethanol lyophilisiert.

Ausbeute: 10,2 mg = 61 % d. Th., farbloses Öl

DC: Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1

5 Rf: 0,4 (Ninhydrin)

RP 18 // Methanol

Rf = 0,8 (Ninhydrin)

IR (fest in KBr):

$\nu_{\text{C=O}}$ 1650, 1680; δ_{NH} 1550, ν_{COOH} 1745 cm^{-1}

10 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) TMS δ 2,8 (SH, 1H), δ 3,0 (N-CH₃, 3H), δ 3,5-4,1 (-CH₂, 8H), δ 8,1-8,2 (CO-NH-, 2H)

[$^{99\text{mTc}}$] Mercaptoacetyl-Sarkosyl-Diglycin

15 1 ml $^{99\text{mTc}}$ -Gluconatlösung wird mit einer Lösung von 0,4 mg Reinsubstanz aus Vorstufe 4, in 0,5 ml Wasser, versetzt. Nach 30 min ist die Umsetzung vollständig.

DC:

(Kieselgel 60, 95 % Ethanol):

20 Zwei Komponenten Rf 0-0,1 (40 %), Rf 0,8 (60 %)

Elektrophorese (pH 7,0):

Beide Komponenten wandern als Anionen.

25

Beispiel 4

Synthese von [$^{99\text{mTc}}$]-Mercaptoacetyl-Hexylglycyl-Diglycin

30 1. Stufe: Hexylglycyl-diglycin

0,0048 mol Chloracetyl-diglycin werden mit 0,05 mol Hexylamin und 5 ml Ethanol versetzt und stehen gelassen.

Nach 6 Tagen wird das Lösungsmittel unter vermindertem

35 Druck entfernt. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Aceton gegeben und erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die gelbe

Lösung abgetrennt und der weiße Rückstand nochmals mit ca. 5 ml Aceton gewaschen. Das Produkt wird auf dem Tonteller getrocknet.

Ausbeute: 610,5 mg (47 % d. Th.)

5 DC:

Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

Rf: 0,3 (Ninhydrin)

RP 18//Methanol, Rf: 0,7 (Ninhydrin)

10 2. Stufe: Chloracetyl-hexylglycyl-diglycin

0,0022 mol Hexylglycyl-diglycin werden in 5 ml 1N Natronlauge gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

15 Anschließend wird die Lösung gekühlt. Bei 0°C werden abwechselnd innerhalb von 30 min 0,3 ml Chloracetylchlorid und 4 ml 1N Natronlauge zugegeben. Dann wird noch 30 min ohne Kühlung gerührt.

20 Nach dem Ansäuern mit 5N Salzsäure wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als gelbes Öl gewonnen. Nach mehrmaligem Extrahieren mit jeweils 100 ml heißem Aceton wird das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 30 ml Aceton aufgeschlämmt. Der weiße Bodensatz wird auf dem
25 Tonteller getrocknet.

Ausbeute: 311 mg (40 % d.Th.)

DC: Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

Rf: 0,75 (Jodbedampfung)

30 3. Stufe: Benzoylmercaptoacetyl-hexylglycyl-diglycin

0,00089 mol Chloracetyl-hexylglycyl-diglycin werden in 70 ml Methanol (spezialrein für Mikroelektronik) gelöst und unter Schutzgas (N₂) gerührt. 0,002 mol Thiobenzoessäure
35 werden in 5 ml Methanol gelöst und mit 0,4 ml Na-Methanolat neutralisiert. Diese Lösung wird unter Schutzgas

langsam zugegeben und noch 12 Stunden weitergerührt. Das Methanol wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 2N HCl aufgenommen. Die Salzsäure wird ebenfalls unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Wasser gewaschen und das Waschwasser durch Abdekantieren entfernt. Der zähflüssige Rückstand wird mit wenig Methanol versetzt und das Produkt fällt aus. Es wird mit Acetonitril gewaschen und auf dem Tonteller getrocknet.

Ausbeute: 253, 3 mg (67 % d. Th.)
DC: Silufol//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1
Rf: 0,8 (UV)

4. Stufe: Mercaptoacetyl-hexylglycyl-diglycin

0,064 (28,8 mg) mmol Benzoylmercaptoacetyl-hexylglycyl-diglycin werden in 2 ml Methanol suspendiert, 2,7 mg 5 % Pd/CaCO₃ zugegeben und an der Hydrierapparatur angebracht. In einem Winkelkolben werden 0,04 ml Na-Methanolat und 1 ml Methanol gegeben. Die Apparatur wird evakuiert und anschließend mit Wasserstoff gespült.

Das Methanolat wird zugegeben und bei einem Wasserstoffdruck von 60 kPa noch 15 min gerührt. Die Lösung wird mit methanolischem Dowex 50WX8 angesäuert, das Harz über einen Faltenfilter abfiltriert (Argonglocke), mit Methanol gewaschen und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 4 ml Benzol extrahiert, das Benzol durch Dekantieren entfernt, der Rückstand erneut in Methanol aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt wurde über eine Sephadex-Säule gereinigt. Ausbeute: 9,8 mg (42 % d. Th.)
DC: Silufol//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1
Rf: 0,5 (Ninhydrin)

^1H -NMR (DMSO) TMS $\delta_{1,2}$ ($-\text{CH}_3$, 3H), $\delta_{3,1}$ (SH, 1H), $\delta_{3,2}$ ($\text{N}-\text{CH}_2$, 1OH), $\delta_{3,7}$ ($-\text{CH}_2$, 6H), $\delta_{3,8}$ (CH_2 -SH, 2H) $\delta_{8,2-8,5}$ ($-\text{NH}$, 2H)

5 [$^{99\text{mTc}}$]-Mercaptoacetyl-hexyl-glycyl-diglycin:

1 ml $^{99\text{mTc}}$ -Gluconatlösung wird mit 400 μl 0,1 N NaOH und
30 μl Vorstufe 4 Lösung - 1,63 mg/100 μl Wasser - ver-
setzt. Nach 40minütigem Stehenlassen wird der Reaktions-
10 ansatz mit 2 ml einer 0,1 M Natriumphosphatpufferlösung
(pH 7,0) neutralisiert. Die Reaktionsmischung ist
mindestens 2 Stunden lang stabil.

DC (Kieselgel 60; 95 % Ethanol): Rf 0,7 (95 %)

Elektrophorese (pH 7,0):

15 Wanderung als Anion

Beispiel 4 a

Anreicherung von [$^{99\text{mTc}}$]-Mercaptoacetyl-Hexyl-glycin-
Diglycin in atherosklerotischen Plaques von Aorten an
20 WHHL-Kaninchen.

99,9 GBq (2,7 mCi) der nach Beispiel 4 markierten Sub-
stanz wurde mit phosphatgepufferter Saline auf 1 ml
verdünnt und einem narkotisierten WHHL-Kaninchen Rom-
25 pun/Ketavet (1:2) über eine Ohrvene appliziert. 5 Stunden
nach Applikation wurde das Kaninchen getötet und sowohl
eine Autoradiographie der Aorta als auch eine Sudan III-
Färbung zur Darstellung der atherosklerotischen Plaques
durchgeführt (Abbildung 1). Der Anreicherungsfaktor
30 zwischen normalen und atherosklerotischen Wandbereichen
betrug je nach Ausbildung der Plaques (Sudan III-Färbung)
zwischen 3 und 5. Die In-vivo-Darstellung eines WHHL-
Kaninchens ist in Abbildung 2 dargestellt.

Beispiel 5

S-Bzl-acetyl-Sar-Gly-Gly- [8 α -Ergolinylamid]

5 200 mg S-Bzl-acetyl-Sar-Gly-Gly-OH und 161 mg Benzotriazol-1-yl-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat wurden in 1 ml N-Methylpyrrolidon gelöst und 172 μ l Diisopropylethylamin addiert. Nach 3 min wird die farblose Lösung zu einer gerührten Lösung von 120 mg 8 α -Amino-ergolin
10 getropft. Die rotbraune Lösung wird bei Raumtemperatur noch 4 Stunden gerührt, wobei der Fortgang der Reaktion HPLC-chromatographisch an einer VYDAC C18 Säule (4,6 x 250 mm) unter Anlegung eines Gradienten von 10 % auf 60 % B in 25 min verfolgt wurde (Laufmittel A 1000 ml Wasser/2
15 ml Trifluoressigsäureanhydrid, Laufmittel B 500 ml Acetonitril/100 ml Wasser/1 ml Trifluoressigsäureanhydrid).

Der Reaktionsansatz wird ohne weitere Vorbehandlung
20 präparativ an einer VYDAC-Säule (40 x 300 mm) unter Anlegung eines Gradienten von 20 % auf 30 % B in 20 min getrennt (Laufmittelzusammensetzung wie oben angegeben). Anschließend wird lyophilisiert.
Ausbeute: 75 mg
25 Ein Massenspektrum zeigte das erwartete Molekulargewicht.

Beispiel 6

S-Bzl-acetyl- [N¹-Hexyl]-Gly-Gy-Gly- [8 α -Ergolinylamid]

30 60 mg S-Bzl-acetyl- [N¹-Hexyl]-Gly-Gy-Gly-OH und 40 mg Benzotriazol-1-yl-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat wurden in 0,6 ml N-Methylpyrrolidon suspendiert und durch Zugabe von 17,2 μ l Diisopropylethylamin in Lösung ge-
35 bracht. Diese Lösung wurde zu einer Lösung von 30 mg 8 α -Amino-ergolin in 0,4 ml N-Methylpyrrolidon getropft. Nach

4 Stunden wurde die Reaktionslösung aufgearbeitet. Die rohe Reaktionsmischung wurde präparativ chromatographiert (wie für Beispiel 5 beschrieben). Anschließend Lyophilisierung ergab das gewünschte Produkt.

- 5 Ausbeute: 30 mg eines pseudokristallinen Produktes.
Das Massenspektrum zeigte das erwartete Molekulargewicht.

Beispiel 7

10 S-Bzl-acetyl-Sar-Gly-[8 α -Ergolinylamid]

- 180 mg S-Bzl-acetyl-Sar-Gly-OH und 161 mg Benzotriazol-1-yl-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat wurden in 1 ml N-methyl-pyrrolidon gelöst und 172 μ l Diisopropylethylamin
15 addiert. Nach 3 min wird die farblose Lösung unter Rühren zu einer Lösung von 120 mg 8 α -Amino-ergolin getropft. Die rotbraune Lösung wird bei Raumtemperatur noch 4 Stunden gerührt und - wie bei Beispiel 5 beschrieben - aufgearbeitet und chromatographiert.

- 20 Ausbeute: 70 mg (Pseudokristallin)
Ein MS zeigte den erwarteten Peak.

Beispiel 8

25 S-Bzl-acetyl-Sar-[8 α -Ergolinyl-amid]

- 120 mg S-Bzl-acetyl-Sar-OH und 161 mg Benzotriazol-1-yl-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat wurden in 1 ml N-methyl-pyrrolidon gelöst und 172 μ l Diisopropylethylamin
30 addiert.

Man setzt dann analog Beispiel 5 um und erhält nach Aufarbeiten und Trennen 52 mg einer pseudokristallinen Verbindung.

Ein MS zeigt den erwarteten Massenpeak.

35

Beispiel 9

3,17 β -Dihydroxy-17 α -[5(S-benzoylthio-acetyl-sarkosyl-glycyl-)amino-pent-1-en-3-in]-1,3,5-estratrien

- 5 Man fügt zu einer Suspension von 130,0 mg 17 β -Hydroxy-17 α -iodvinyl-1,3,5-estratrien-3-tetrahydropyranyl-ether, 0,35 g [S-Benzoyl-thioacetyl-sarkosyl-glycyl-propargylamid], 11,0 mg Benzyl-triethyl-ammoniumchlorid, 11,5 mg Tetrakis-(triphenylphosphin) palladium (0), 9 mg
10 Kupfer-(I)-iodid, in 5 ml Toluol suspendiert und rührt 90 Stunden bei Raumtemperatur. Man versetzt mit Wasser, extrahiert mit Toluol und trocknet. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 10 ml Tetrahydrofuran aufgenommen, mit 190 mg Pyridinium-
15 paratoluolsulfonsäure in 5 ml Ethanol versetzt und 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und man reinigt mit Methylenchlorid/Methanol (8:1) an einer Silicagelsäule.
20 Ausbeute: 30 % d. Th.

Die Substanz zeigt im DC (CH₂Cl₂/MeOH) 5 : 5 einen R_f von 0,4.

25

Beispiel 10

3,17 β -Dihydroxy-17 α -[N-(benzoyl-thio-acetyl-sarkosyl-glycyl)-amino-propin-1]-1,3,5 estratrien

30

- Man fügt zu einer Suspension von 110 mg 17 β -Hydroxy-17 α -propargyl-amino-1,3,5-estratrien-3-tetrahydropyranyl-ether, in 3 ml DMF 350 mg S-Benzoyl-thioacetyl-sarkosyl-glycin in 3 ml DMF. Man rührt bei 100°C 24 Stunden unter
35 Schutzgas.

Nach Zugabe von 10 ml Tetrahydrofuran, saugt man vom Kristallisat ab und engt unter vermindertem Druck ein. Der Rückstand wird in 20 ml Tetrahydrofuran aufgenommen, mit 100 mg Pyridinium-para-toluolsulfonsäure in 3 ml Ethanol gelöst, versetzt und 1 Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen des Lösemittels wird an Silica-gel-Niederdrucksäule im System Methanol/Methylenchlorid (1:8) gereinigt.

Die Substanz zeigte im DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) 5 : 5 einen Rf von 0,6.

Ausbeute: 71 mg

Beispiel 11

0,001 mol S-Bzl-acetyl-Sar-Gly-OH und 322 mg Benzotriazol-1-yl-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat werden in 3 ml DMF gelöst unter Zugabe von 344 μl Diisopropylethylamin. Es wird zur Bildung des Benzotriazolesters 5 Minuten voraktiviert und anschließend die klare Lösung zu 33 mmol geschütztem His(Trt)-Leu-Asp(OBut)-Ile-Ile-Trp-Harz addiert. Die Suspension wird eine Stunde gerührt, anschließend mehrfach mit DMF gewaschen, abgesaugt und getrocknet. Das getrocknete Harz wird dann wie üblich mit TFA/Scavenger behandelt, um das Produkt von den Schutzgruppen zu befreien. Die Reinigung wird wie für Beispiel 5 beschrieben ausgeführt.

Die nach Beispiel 10 erhaltene Verbindung wird nach dem als allgemeine Methode (Beispiel 1) angegebenen Verfahren mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ komplexiert.

Beispiel 12

0,010 mol His(Trt)-Leu-Asp(OBut)-Ile-Ile-Trp-OH, hergestellt am Sasrin-Harz, werden in einem Gemisch aus DMF/NMP unter Zugabe von 0,010 mol Diisopropylethylamin gelöst und unter Rühren mit 0,010 mol S-Bzl-acetyl-Sar-OH, vorbereitet wie unter Beispiel 11, gelöst in 3 ml DMF versetzt. Es wird 2 Stunden gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der verbleibende Rückstand wird mit Wasser verrührt und abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Die Schutzgruppen werden wie üblich entfernt und das Produkt durch Eingießen in Ether erhalten. Die Reinigung wird wie für Beispiel 5 beschrieben ausgeführt.

S-Bzl-acetyl-[N14-Bromphenyl]-Gly-Gly-Gly-OH

1. Stufe: Chloracetyldiglycin

10 g Glycinanhydrid werden in einem 250 ml Dreihalskolben in 50 ml 2N Natronlauge bei Raumtemperatur gelöst. Nach 45 min wird die noch etwas trübe Lösung auf etwa 0 °C abgekühlt und 11,1 g (7,8 ml) Chloracetylchlorid und 24 ml 5N Natronlauge im Wechsel unter Rühren zugetropft. Nach 45 min ist die Zugabe beendet. Die Lösung färbt sich leicht rosa. Anschließend werden 40 ml 5N Salzsäure zugegeben, wobei sich die Lösung entfärbt und die Substanz zu kristallisieren beginnt. Man läßt noch ca. 1 Stunde bei 0 °C stehen und saugt den Niederschlag ab. Er wird mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und aus heißem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 5 g

Schmp.: 173-174 °C

Die Mutterlauge wird unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand wird ebenfalls aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 2,5 g

Schmp.: 173 °C

Gesamtausbeute: 7,5 g = 41 % d.Th.

DC:

Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1

5

2.Stufe: 4-Bromphenyl-triglycin

0,0144 mol Chloracetyldiglycin werden mit 0,029 mol 4-Bromanilin in 20 ml Ethanol und 20 ml 1N NaOH 7 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der verbleibende Rückstand dreimal mit je 50 ml warmen Aceton extrahiert. Das zurückbleibende Produkt wird aus heißem Wasser umkristallisiert. Das Rohprodukt wird in Stufe 3 eingesetzt.

15 Ausbeute: ca. 60 %.

3.Stufe: Chloracetylierung von 4-Bromphenyl-triglycin

0,01 mol 4-Bromphenyl-triglycin werden in 10 ml 1N NaOH bei Raumtemperatur gelöst und dann bei 0°C unter Rühren abwechselnd mit 0,012 mol Chloracetylchlorid und 20 ml 1N NaOH innerhalb von 30 min versetzt. Man läßt weitere 30 min rühren, säuert mit 5N HCl an und engt das Produkt unter vermindertem Druck zur Trockne ein. Die dabei anfallenden Kristalle werden in heißem Wasser gelöst und die Lösung mit Ethanol versetzt. Das ausfallende Natriumchlorid wird abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Durch mehrmaliges Behandeln mit jeweils 30 ml heißem Aceton wird das gewünschte Produkt extrahiert, das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 50% d.Th.

DC:

35 Silufol//n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1

Rf: 0,6

4. Stufe: S-Bzl-acetyl- [N¹-Bromphenyl]-Gly-Gly-Gly-OH

0,01 mol des Chloracetylproduktes werden in 140 ml
5 Methanol unter Rühren und Schutzgas bei Raumtemperatur
gelöst. Hierzu werden 0,02 mol Thiobenzoessäure in 20 ml
Methanol gelöst und mit Natriummethylat neutralisiert,
unter Rühren und unter Schutzgas langsam zugetropft und
10 noch weitere 12 Stunden gerührt. Man entfernt das Lö-
sungsmittel unter vermindertem Druck und nimmt den Rück-
stand mit 2N HCl auf. Die dabei anfallenden Kristalle
werden abgesaugt und mit warmem Wasser neutral gewaschen.
Anschließend wäscht man noch mit 20 ml Chloroform, 20 ml
Acetonitril und 20 ml Ether und trocknet den Rückstand
15 unter vermindertem Druck.
Ausbeute: 60% d.Th.

5. Stufe: Thio-acetyl- [N¹-Bromphenyl]-Gly-Gly-Gly-OH

20 0,08 mmol Substanz von Stufe 4 werden mit 2 ml wasser-
freiem Methanol suspendiert, mit 2 mg Pd/CaCO₃ (5%) ver-
setzt und bei einem Wasserstoffdruck von 66 kPa unter
Rühren mit einer Lösung von 0,13 mmol Natriummethylat in
1 ml absolutem Methanol umgesetzt. Man rührt noch 15 Min
25 und neutralisiert danach die Lösung mit methanolischem
Dowex 50WX8. Der Katalysator und das Harz werden abfil-
triert, die Substanz lyophilisiert und mit 2 ml Benzol
extrahiert. Anschließend wird das Benzol abgetrennt und
die Substanz aus Ethanol lyophilisiert. Die Reinigung
30 erfolgt mittels präparativer HPLC.
DC: Silufol//Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1
Rf: 0,8
Ausbeute: 40% d.Th.

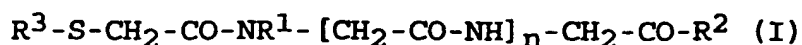
35 ^{99m}Tc [Thioacetyl- [N¹-4-Bromphenyl]-Gly-Gly-Gly-OH

Wie zur allgemeinen Komplexierung vor Beispiel 1 beschrieben, wird Thio-acetyl-[N¹-Bromphenyl]-Gly-Gly-Gly-OH mit einem [^{99m}Tc]-Gluconat-Präparation umgesetzt.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I

5



worin

10 n eine Zahl 0,1 oder 2 bedeutet,

15 R^1 einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, welcher gegebenenfalls durch ein bis drei Sauerstoffatome unterbrochen oder substituiert ist, und welcher gegebenenfalls eine endständige -COOH-, -OH- oder -NH₂-Gruppe trägt, welche gegebenenfalls mit Glykolsäure oder Glykolsäureestern oder -ethern verestert oder verethert ist,

20 wobei die Ester oder Ether mit Carbonsäuren oder Alkoholen mit bis zu 18 Kohlenstoffatomen gebildet werden,

25 oder einen Phenyl- oder Cyclohexylrest darstellt, welcher gegebenenfalls in der 4-Position mit einer COOH-, NH₂- oder OH-Gruppe, welche gegebenenfalls mit Carbonsäuren oder Alkoholen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen verestert, verethert oder amidiert ist oder einem Halogenatom substituiert ist,

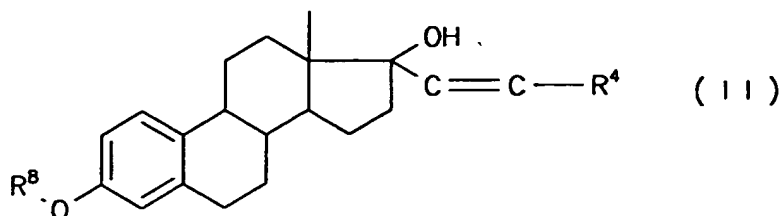
30 R^2 ein Halogenatom, eine Halogenmethyl-, Methylcarboxyl-, Trifluormethylcarboxyl, eine NH₂- oder eine OH-Gruppe darstellt,

35 wobei die im Falle von $R^2 = OH$ gebildete Carboxyl-Gruppe entweder unmittelbar oder nach Veresterung mit einer α,ω -Hydroxycarbonsäure mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen über deren endständige Carboxyl-Gruppe mit einem Biomolekül, einem

5 Steroid, einem Ergolinderivat, einem Benzo-
diazepinderivat, einem Cholecystokinin, einem
Peptid, einem Protein, einem Proteohormon, einem
Aminozucker, einem Endothelin, einem Endothelin-
Derivat, einem Endothelin-Antagonisten oder ei-
nem Endothelinfragment verestert oder amidiert
ist,

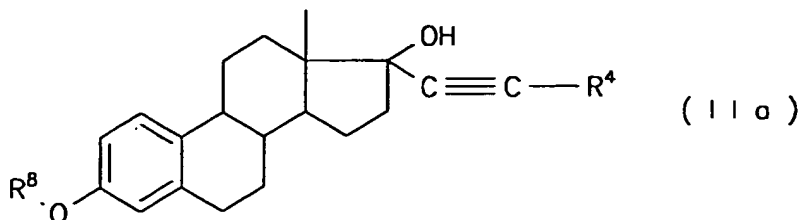
ein Rest der allgemeinen Formel II

10



oder der allgemeinen Formel II a

15



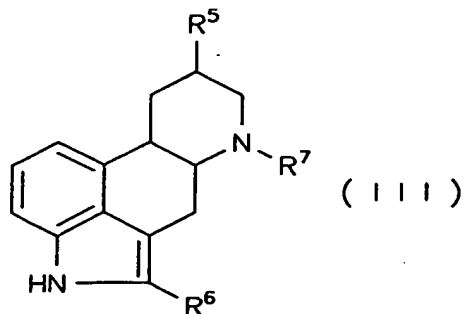
ist, wobei

20 R^4 eine Methylen-, Propenylamino-, Propinyl-
amino-, Methylenamino- oder Methylenoxygruppe und

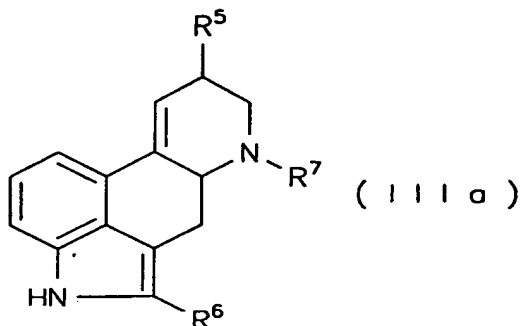
R^8 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe be-
deutet,

25

einen Rest der allgemeinen Formel III



5 oder der allgemeinen Formel III a



darstellt, worin

10

R^5 eine -NH-, -NH-CO-N<, -NH-CO-NH- oder Methylenoxygruppe,

15

R^6 ein Wasserstoffatom, ein Halogenatom oder eine Methylgruppe und

20

R^7 ein Wasserstoffatom oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen bedeuten,

25

R^3 ein Wasserstoffatom, eine Acetyl-, Benzoyl-, p-Methoxybenzyl-, Acetamidomethyl-, Benzamidomethyl-, Trimethylacetamidomethyl-, Hydroxyacetyl-, Ethoxyethyl-, Ethylthio-, Trityl- oder eine leicht abspaltbare Schwefelschutzgruppe bedeutet

und deren Salze mit pharmazeutisch annehmbaren Säuren oder Basen.

5

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 ein geradkettiger oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen oder ein p-Bromphenylrest ist.

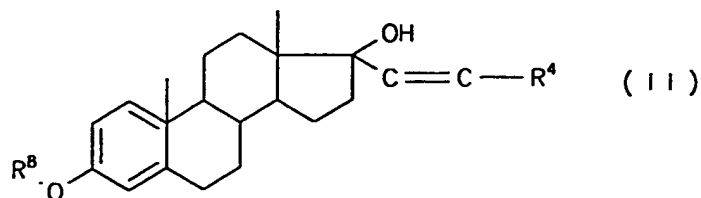
10

3. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß R^2 eine OH- oder CH_3 -O-Gruppe darstellt.

15

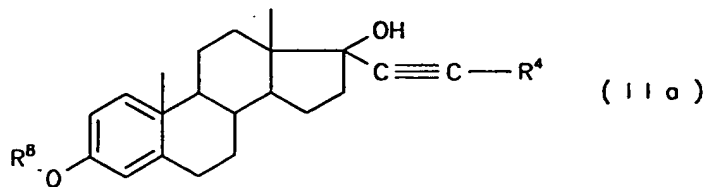
4. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß R^2 ein Rest der allgemeinen Formel II

20



oder der allgemeinen Formel II a

25



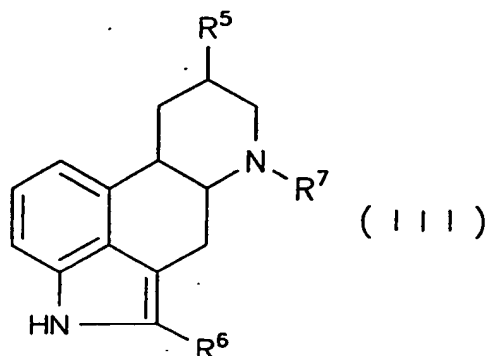
ist, wobei

R^4 eine Methylen- oder Propinylaminogruppe und

R^8 ein Wasserstoffatom bedeutet.

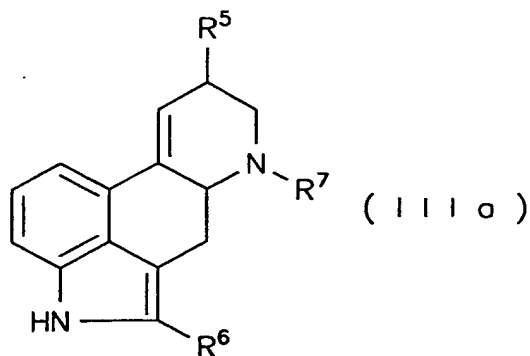
5

5. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß R^2 ein Rest der allgemeinen Formel III



10

oder der allgemeinen Formel III a



15

ist, wobei

R^5 eine NH-Gruppe,

20

R^6 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe und

R^7 einen Methyl-, Ethyl- oder n-Propylrest darstellen.

6. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis
5, dadurch gekennzeichnet, daß R^3 ein Wasserstoffatom
oder ein Benzoylrest ist.

7. Verbindungen nach Anspruch 1, nämlich

10 17 α -[5-(Mercapto-acetyl-sarkosyl-glycyl-amino-1-
penten-3-ynyl] estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol,

6-N-Methyl-8 α -amino-[8 α -N-(thio-acetyl-sarkosyl-
glycyl-glycyl)]ergolin,

15 6-N-Methyl-8 α -amino-[8 α -N-(thio-acetyl-sarko-
syl)]ergolin,

20 6-N-Methyl-8 β -hydroxymethylen-[O-(thio-acetyl-sarko-
syl-glycyl-glycyl)]ergolin und

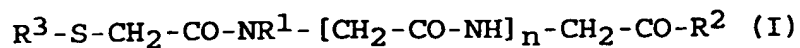
6-N-Methyl-8 β -hydroxymethylen-[O-(thio-acetyl-sarko-
syl-glycyl)]ergolin.

25

8. Metallchelatkomplexe radioaktiver Metallionen der
Elemente Tc, Re, Cu, Ga, Gd, Y und In mit

Verbindungen der allgemeinen Formel I

30

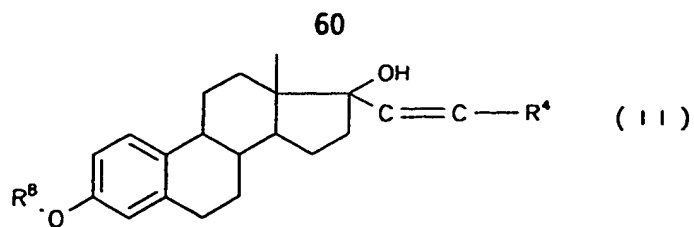


worin

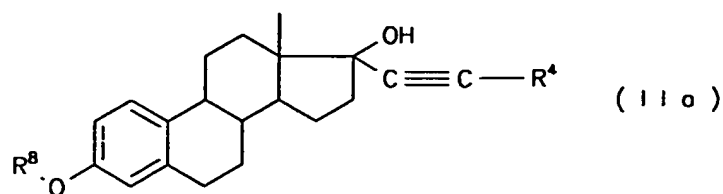
35

n eine Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet,

- 5 R^1 einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, welcher gegebenenfalls durch ein bis drei Sauerstoffatome unterbrochen oder substituiert ist, und welcher gegebenenfalls eine endständige -COOH-, -OH- oder -NH₂-Gruppe trägt, welche gegebenenfalls mit Glykolsäure oder Glykolsäureestern oder -ethern verestert oder verethert ist,
- 10 wobei die Ester oder Ether mit Carbonsäuren oder Alkoholen mit bis zu 18 Kohlenstoffatomen gebildet werden,
- 15 oder einen Phenyl- oder Cyclohexylrest darstellt, welcher gegebenenfalls in der 4-Position mit einer COOH-, NH₂- oder OH-Gruppe, welche gegebenenfalls mit Carbonsäuren oder Alkoholen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen verestert, verethert oder amidiert ist oder einem Halogenatom substituiert ist,
- 20 R^2 ein Halogenatom, eine Halogenmethyl-, Methylcarboxyl-, Trifluormethylcarboxylgruppe, eine NH₂- oder eine OH-Gruppe darstellt,
- 25 wobei die im Falle von $R^2 = OH$ gebildete Carboxyl-Gruppe entweder unmittelbar oder nach Veresterung mit einer α,ω -Hydroxycarbonsäure mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen über deren endständige Carboxyl-Gruppe mit einem Biomolekül, einem Steroid, einem Ergolinderivat, einem Benzodiazepinderivat, einem Cholecystokinin, einem Peptid, einem Protein, einem Proteohormon, einem
- 30 Aminosucker, einem Endothelin, einem Endothelin-Derivat, einem Endothelin-Antagonisten oder einem Endothelinfragment verestert oder amidiert ist,
- 35 ein Rest der allgemeinen Formel II



oder der allgemeinen Formel II a

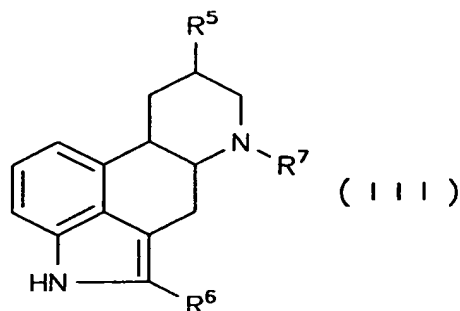


ist, wobei

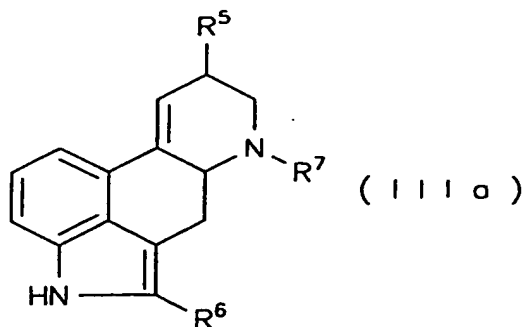
R^4 eine Methylen-, Propenylamino-, Propinylamino-, Methylenamino- oder Methylenoxygruppe und

R^8 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe bedeutet,

einen Rest der allgemeinen Formel III



oder der allgemeinen Formel III a



darstellt, worin

- 5 R^5 eine -NH-, -NH-CO-N<, -NH-CO-NH- oder Methylenoxygruppe,
- R^6 ein Wasserstoffatom, ein Halogenatom oder eine Methylgruppe und
- 10 R^7 ein Wasserstoffatom oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen darstellt,
- 15 R^3 ein Wasserstoffatom, eine Acetyl-, Benzoyl-, p-Methoxybenzyl-, Acetamidomethyl-, Benzamidomethyl-, Trimethylacetamidomethyl-, Hydroxyacetyl-, Ethoxyethyl-, Ethylthio-, Trityl- oder eine leicht abspaltbare Schwefelschutzgruppe bedeutet
- 20 und deren Salze mit pharmazeutisch annehmbaren Säuren oder Basen.
- 25 9. Metallchelatkomplexe nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die radioaktiven Metallionen Isotope der Elemente Tc und Re sind.

10. Metallchelatkomplexe nach mindestens einem der Ansprüche 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Radioisotop Technetium-99m ist.
- 5 11. Verbindungen nach Anspruch 8, nämlich
- [^{99m}Tc]-Mercaptoacetylsarkosin,
[^{99m}Tc]-Mercaptoacetyl-sarkosyl-diglycin,
[^{99m}Tc]-Mercaptoacetyl-hexyglycyl-diglycin und
10 [^{99m}Tc]-Mercaptoacetyl-N¹-[4-Bromphenyl]-glycyl-glycyl-glycin.
12. Konjugate, enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel I oder Metallchelatkomplexe radioaktiver
15 Metallionen der Elemente Tc, Re, Cu, Ga, Gd, Y und In mit Verbindungen der allgemeinen Formel I und sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernde Substanzen, wobei zwischen diesen eine kovalente Bindung besteht und diese im Falle von Carboxy- oder Amino-
20 gruppen enthaltenden Substanzen wie Peptiden, Proteinen, Antikörpern oder deren Fragmenten, amidisch oder im Falle von Hydroxygruppen enthaltenden Substanzen wie Fettalkoholen, esterartig oder im Falle von Aldehydgruppen enthaltenden Substanzen imidisch
25 vorliegt.
13. Konjugate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die sich im erkrankten Gewebe anreichernden Substanzen Peptide wie Endotheline, Teilsequenzen von
30 Endothelinen, Endothelin-Analoga, Endothelin-Derivate oder Endothelin-Antagonisten bedeuten.
14. Konjugate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide die folgenden Sequenzen
35

5 Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

10 Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

15 Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

20 Cys-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

25 Cys-Ser-Cys-Asn-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

30 Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Asn-
Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp,

35 Ala-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

40 Ala-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

45 Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

50 Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

N-Acetyl-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-
Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

5

oder die Teilsequenz

His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp

10

oder die cyclischen Aminosäuresequenzen

Cyclo- (DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu) ,

15

Cyclo- (DGlu-Ala-alloDIle-Leu-DTrp)

aufweisen.

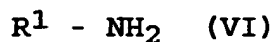
15. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allge-
meinen Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man

20

- a) ein Diketopiperazinderivat des Glycins oder
- b) Glycin

25

mit einem Halogencarbonsäurehalogenid und
anschließend mit einem Amin der allgemeinen Formel VI



30

wobei R^1 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat,
umsetzt, erneut mit einem Halogencarbonsäurehalogenid
umsetzt und anschließend mit einer Verbindung der
allgemeinen Formel IV

35



wobei R^3 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat,

umsetzt

oder eine Verbindung der allgemeinen Formel V

5



wobei R^2 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat,
mit einem Halogencarbonsäurehalogenid und an-
schließend mit einem Amin der allgemeinen Formel VI

10



wobei R^1 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat,
umsetzt, erneut mit einem Halogencarbonsäurehalogenid
umsetzt und anschließend mit einer Verbindung der
allgemeinen Formel IV

15



20

wobei R^3 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat,
umsetzt und daß man diese Verbindung gegebenenfalls
mit einer pharmazeutisch annehmbaren Säure oder Base
in deren Salz überführt.

25

16. Verfahren zur Herstellung von Metallchelatkomplexen
radioaktiver Metallionen der Elemente Tc und Re mit
Verbindungen der allgemeinen Formel I, dadurch ge-
kennzeichnet, daß Technetium-99m oder Re in Form von
Pertechetat oder Perrhenat in Gegenwart eines Reduk-
tionsmittels und gegebenenfalls eines Hilfsliganden
mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I

30



35

worin R^1 , R^2 und R^3 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, umgesetzt wird.

- 5 17. Kit zur Herstellung von Radiopharmaka, bestehend aus
einer Verbindung der allgemeinen Formel I gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 7 oder einem Konjugat gemäß einem
der Ansprüche 12 bis 14, sowie einem Reduktionsmittel
und gegebenenfalls einem Hilfsliganden, die in
trockenem Zustand oder in Lösung vorliegen, sowie
10 einer Gebrauchsanweisung mit einer Reaktionsvor-
schrift zur Umsetzung der beschriebenen Verbindungen
mit Technetium-99m oder Re in Form einer Pertech-
netatlösung oder Perrhenatlösung.
- 15 18. Radiopharmazeutische Zusammensetzung zur nicht inva-
siven in vivo Darstellung von Rezeptoren und rezept-
orhaltigem Gewebe und/oder von atherosklerotischen
Plaques und/oder zur Nierenfunktionsprüfung, dadurch
gekennzeichnet, daß sie eine Verbindung nach einem
20 der Ansprüche 8 bis 10 oder einem Konjugat gemäß ei-
nem der Ansprüche 12 bis 14 sowie gegebenenfalls mit
den in der Galenik üblichen Zusätzen enthält, wobei
die Verbindung in einem Kit nach Anspruch 17 mit
Technetium-99m oder Re in Form einer Pertechnetatlö-
25 sung oder Perrhenatlösung zubereitet wird.

Fig. 1

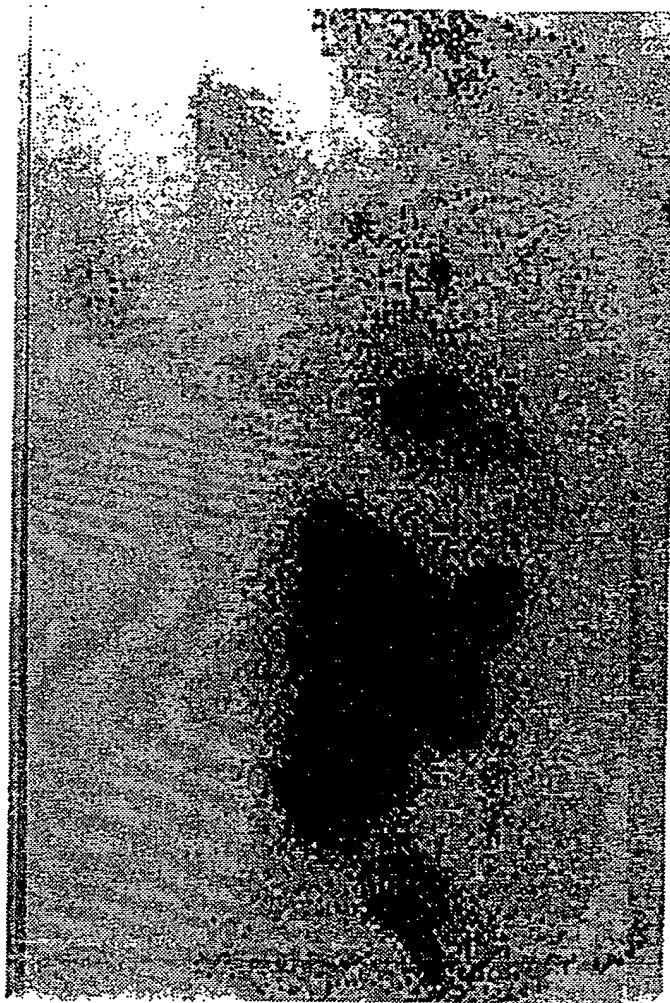
Sudan III-Färbung und Autoradiographie der Aorta eines
WHHL-Kaninchens



2/2

Fig. 2

Planare Aufnahme eines WHHL-Kaninchens 5 h p.i. von
[^{99m}Tc]-Mercaptoacetyl-Hexyl-glycin-Diglycin



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/01295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/062 C07K5/083 C07C327/26 C07C323/52 A61K51/04
A61K51/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,94 22491 (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST ;ERBER SEBASTIAN (DE); DINKELBORG LUDGER) 13 October 1994 see the whole document see in particular the examples 15-16 ---	1-18
P,X	WO,A,93 23085 (DIATECH INC ;DEAN RICHARD T (US); LISTER JAMES JOHN (US)) 25 November 1993 see 5 and 6 compound of page 27 see claims ---	1,8-10, 12,15-18
X	GB,A,2 077 719 (NORTON NORWICH PRODUCTS INC) 23 December 1981 see claims; examples 7,9 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 1995

Date of mailing of the international search report

09.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/01295

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 19274 (MALLINCKRODT MEDICAL INC) 12 November 1992 see the whole document ---	1-18
A	WO,A,93 15771 (MALLINCKRODT MEDICAL INC) 19 August 1993 see the whole document ---	1-18
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 13, 27 September 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 139794, page 947; column r; see abstract & JP,A,05 070 484 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 23 March 1993 ----	13,14
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 2, no.5, September 1991 - October 1991 WASHINGTON US, pages 353-366, J.P. DIZIO ET AL. 'Progestin-Rhenium Complexes: Metal-Labeled Steroids with High Receptor Binding Affinity, Potential Receptor-Directed Agents for Diagnostic Imaging or Therapy' see page 363 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 94/01295

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9422491	13-10-94	DE-A- 4311021 AU-B- 6501594	27-10-94 24-10-94
WO-A-9323085	25-11-93	AU-B- 4384593 CA-A- 2136330	13-12-93 25-11-93
GB-A-2077719	23-12-81	AU-A- 6808181 BE-A- 889152 DE-A- 3122541 FR-A- 2483916 JP-A- 57026656 NL-A- 8101163 SE-A- 8102455	17-12-81 09-12-81 25-03-82 11-12-81 12-02-82 04-01-82 10-12-81
WO-A-9219274	12-11-92	AU-A- 1995392	21-12-92
WO-A-9315771	19-08-93	US-A- 5310536 AU-B- 3610593 EP-A- 0630264	10-05-94 03-09-93 28-12-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: ionales Aktenzeichen

PCT/DE 94/01295

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K5/062 C07K5/083 C07C327/26 C07C323/52 A61K51/04
A61K51/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO,A,94 22491 (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST ;ERBER SEBASTIAN (DE); DINKELBORG LUDGER) 13.Oktober 1994 siehe das ganze Dokument siehe besonders die Beispiele 15-16 ---	1-18
P,X	WO,A,93 23085 (DIATECH INC ;DEAN RICHARD T (US); LISTER JAMES JOHN (US)) 25.November 1993 siehe 5. und 6. Verbindungen auf Seite 27 siehe Ansprüche ---	1,8-10, 12,15-18
X	GB,A,2 077 719 (NORTON NORWICH PRODUCTS INC) 23.Dezember 1981 siehe Ansprüche; Beispiele 7,9 ---	1
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3.März 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09.03.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/01295

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,92 19274 (MALLINCKRODT MEDICAL INC) 12.November 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-18
A	WO,A,93 15771 (MALLINCKRODT MEDICAL INC) 19.August 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-18
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 13, 27.September 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 139794, Seite 947; Spalte r; siehe Zusammenfassung & JP,A,05 070 484 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 23.März 1993 ---	13,14
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 2, no.5, September 1991 - Oktober 1991 WASHINGTON US, Seiten 353-366, J.P. DIZIO ET AL. 'Progestin-Rhenium Complexes: Metal-Labeled Steroids with High Receptor Binding Affinity, Potential Receptor-Directed Agents for Diagnostic Imaging or Therapy' siehe Seite 363 -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/01295

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9422491	13-10-94	DE-A- 4311021	27-10-94
		AU-B- 6501594	24-10-94
WO-A-9323085	25-11-93	AU-B- 4384593	13-12-93
		CA-A- 2136330	25-11-93
GB-A-2077719	23-12-81	AU-A- 6808181	17-12-81
		BE-A- 889152	09-12-81
		DE-A- 3122541	25-03-82
		FR-A- 2483916	11-12-81
		JP-A- 57026656	12-02-82
		NL-A- 8101163	04-01-82
		SE-A- 8102455	10-12-81
WO-A-9219274	12-11-92	AU-A- 1995392	21-12-92
WO-A-9315771	19-08-93	US-A- 5310536	10-05-94
		AU-B- 3610593	03-09-93
		EP-A- 0630264	28-12-94